

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

CONCEPTION ET SYNTHÈSE DE MANNOPYRANNOSIDES
COMME INHIBITEURS SÉLECTIFS DU FIMH CHEZ
LES SOUCHES UROPATHOGENES D'*ESCHERICHIA COLI*

MÉMOIRE PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR
SYLVAIN ROCHELEAU

OCTOBRE 2010

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

*La complexité
peut se décomposer
en une multitude d'éléments
plus simples.*

*Je dédie ce mémoire à
mon père, ma mère
et mon frère*

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de recherche, le professeur René Roy, de m'avoir accepté dans son laboratoire. Merci de m'avoir fait confiance, d'avoir cru en la modélisation moléculaire, merci de votre patience et de votre compréhension.

Ensuite, je voudrais remercier le docteur Suzanne Sirois qui m'a initié à la modélisation moléculaire en me formant sur le logiciel MOE.

Je tiens tous particulièrement à remercier mon frère, Nicolas Rocheleau, de m'avoir montré à peu près tout ce que je connais au niveau informatique. Sans lui, je n'aurais probablement pas autant de facilité dans ce domaine. Merci NIK0!

Je voudrais remercier le docteur Mohamed Touaibia d'avoir tout d'abord initié le projet sur les mannopyrannosides et aussi de m'avoir initié au laboratoire de chimie des sucres. C'est avec lui que j'ai lancé mes premières réactions, que j'ai purifié mes premiers produits et que j'ai analysé mes premiers spectres RMN en tant que membre officiel du laboratoire Roy.

Un gros merci à Tze Chieh Shiao pour ses précieux conseils sur la chimie des sucres ainsi que pour son support matériel et informatique. Il est un modèle à suivre au niveau de l'organisation du travail, des papiers et de la propreté. Merci à tous ses petits trucs qui font que ça fonctionne mieux et plus vite!

Merci au docteur Denis Giguère, « l'encyclopédie vivante », qui sait retrouver dans son cerveau n'importe quel papier de tel auteur sur tel sujet en telle année dans tel journal! Merci aussi pour les discussions que nous avons eues tant au niveau chimie qu'à d'autres niveaux.

Merci beaucoup au docteur Yoann Chabre qui est un exemple à suivre au niveau de la rigueur, de la patience, de l'écoute, du comportement au laboratoire, de la sécurité, de la double-vérification, du français, de la culture, de l'humour, etc...

Aussi, je remercie mon collègue de hotte, Julien Martel de m'avoir enduré ces dernières années. Je remercie également mes collègues de bureau, Philippe Cloutier et François Héroux. Je tiens à remercier tous les autres collègues que j'ai côtoyés tout au long de la maîtrise et avec qui j'ai travaillé de près ou de loin (en ordre alphabétique): Leïla Abbassi, Patrick Brisebois, Milan Bergeron-Brlek, Marc-André Bonin, Jérémy Cuenin, Sonia Damerval, Daniel Fortin, Justin Komguem, Vincent Kondratek, Marie-Christine Lacasse, Alexandre Lado, Rostand Manfouo, Amira Moheb, Emilie Morisse, Mathieu Neault, Alex Papadopoulos, Christine Pépin, Virginie Placide, Subhash Rauthu, Rabindra Rej, Jacques Rodrigue, Marie-Hélène Thibault et Steve Tremblay.

Finalement, je voudrais remercier ma copine Fanie Bourgault pour ses encouragements, son écoute et sa compréhension.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES TABLEAUX	xiv
LISTE DES SCHÉMAS	xvi
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES	xx
RÉSUMÉ	xxx

CHAPITRE I

INTRODUCTION	1
1.1 L'IMPORTANCE DES SUCRES DANS LA NATURE	1
1.2 PROTÉINES LIANT LE MANNOSE	8
1.2.1 L'anticorps monoclonal humain 2G12	9
1.2.2 Protéine humaine liant le mannose	14
1.2.3 Macrophages et cellules dendritiques	15
1.2.4 Lectines bactériennes	16
1.3 INFECTIONS DU TRACTUS URINAIRE ET <i>ESCHERICHIA COLI</i>	17
1.4 OBJECTIFS GÉNÉRAUX	24

CHAPITRE II

SYNTHÈSE DE MANNOPYRANNOSIDES	25
2.1 INTRODUCTION	25
2.2 α -D-MANNOPYRANNOSIDES MODIFIÉS EN C-2	26
2.2.1 α -D-Mannopyrannosides de méthyle	28
2.2.2 α -D-Mannopyrannosides d'allyle	42
2.3 α -D-MANNOPYRANNOSIDES MODIFIÉS EN C-6	47
2.3.1 α -D-Mannopyrannosides de méthyle	48
2.3.2 α -D-Mannopyrannosides d'allyle	52
2.3.3 α -D-Rhamnopyrannosides d'allyle	62

CHAPITRE III	
DÉVELOPPEMENT D'UN MODÈLE QSAR	68
3.1 INTRODUCTION AUX INTERACTIONS INTERMOLECULAIRES	68
3.2 MINIMISATION DE L'ÉNERGIE À L'AIDE DE FORECASTER 2.5	72
3.2.1 Utilisation de ProCESS	76
3.2.2 Utilisation de SMART	82
3.2.3 Utilisation de FITTED	83
3.3 UTILISATION DE MOE 2007.09	88
3.3.1 Recherche de descripteurs moléculaires	91
3.3.2 Prédiction de valeurs de K_d	106
3.3.3 Arrimage moléculaire sur le FimH	109
CHAPITRE IV	
TRAVAUX DIVERS EN MODÉLISATION MOLÉCULAIRE	113
4.1 INTRODUCTION	113
4.2 COMPARAISON ENTRE LES GALECTINES HUMAINES	114
4.3 MINIMISATION DE L'ÉNERGIE DE DENDRIMÈRES	121
CHAPITRE V	
CONCLUSIONS GÉNÉRALES	131
CHAPITRE VI	
PARTIE EXPÉRIMENTALE	133
6.1 GÉNÉRALITÉS	133
6.1.1 Solvants	133
6.1.2 Chromatographie	134
6.1.3 Analyse physico-chimiques	134
6.1.3.1 Généralités	134
6.1.3.2 Spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	135
6.2 MODES OPÉRATOIRES ET CARACTÉRISATION	136

ANNEXES	168
---------------	-----

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	La pyramide de la complexité de la vie.	1
Figure 1.2	Les 68 molécules de la vie divisées en 4 catégories: les nucléosides, les acides aminés, les lipides et les glycanes.	2
Figure 1.3	a) Structure générale d'un acide désoxyribonucléique (R_1 = base nucléique) b) Structure générale d'un acide aminé (R_2 = chaîne latérale) c) Structure du D-mannose (un représentant des hexopyrannoses) et mise en évidence de ses stéréocentres.	3
Figure 1.4	Équilibres impliqués dans la réaction de formose proposée par Breslow en 1959.	4
Figure 1.5	Paires de bases Watson-Crick entre: a) l'adénine et la thymine b) la guanine et la cytosine. Les donneurs de ponts H sont représentés en bleu, les accepteurs en rouge.	6
Figure 1.6	Représentations imagées des interactions protéine-ligand: a) Analogie clef-serrure b) Analogie du casse-tête.	7
Figure 1.7	a) Virus de l'immunodéficience humaine (VIH) b) Fab 2G12 complexée avec Man ₉ GlcNAc ₂ (code PDB 1OP5).	10
Figure 1.8	La glycoprotéine transmembranaire gp41 surmontée de la glycoprotéine gp120 formant ainsi un homotrimère.	10
Figure 1.9	a) <i>Canavalia ensiformis</i> b) Con A complexée au mannotriose (code PDB 1CVN) c) <i>Nostoc ellipsosporum</i> d) CV-N complexée à Man-9 (code PDB 3GXZ) e) <i>Galanthus nivalis</i> f) GNA complexée au MeMan (code PDB 1MSA) g) <i>Griffithsia sp.</i> h) GRFT complexée avec D-Man (code PDB 2GUD) i) <i>Morus nigra</i> j) MNL complexée avec D-Man (code PDB 1XXR) k) <i>Microcystis viridis</i> l) MVL complexée avec Man ₃ GlcNAc ₂ (code PDB 1ZHS) m) <i>Narcissus pseudonarcissus</i>	

	n) NPL complexée avec 3 α -mannobiose (code PDB 1NPL)	
	o) <i>Scilla campanulata</i>	
	p) SCL non-complexée (code PDB 1B2P).	11
Figure 1.10	a) Structure « bouquet » d'une collectine trimérique b) trimère de la hMBP complexée à un oligomannose (sphères jaunes = ions calcium).	15
Figure 1.11	a) Cellule dendritique humaine b) DC-SIGN complexée à GlcNAc ₂ Man ₃ (Code PDB 1K9J).	16
Figure 1.12	a) <i>Escherichia coli</i> uropathogène et ses pili d'adhésion b) FimH complexé au D-mannose (Code PDB 1KIU).	17
Figure 1.13	Situation relative des FimA à FimI dans la séquence ADN d' <i>E. coli</i> uropathogène.	18
Figure 1.14	Schématisation d'un pili chez <i>E. coli</i> uropathogène: FimA est représenté en rouge, FimF en orange foncé, FimG en orange pâle et FimH en jaune. ...	18
Figure 1.15	Les 11 brins β constituant la structure secondaire du FimH.	19
Figure 1.16	Superposition des complexes FimH-BuMan « porte ouverte » en rouge (Code PDB 1TR7) et « porte fermée » en bleu (Code PDB 1UWF).	21
Figure 1.17	a) FimH sans ligand (Code PDB 1QUN) b) complexé au D-mannose (Code PDB 1KLF) c) complexé au α -D-mannopyrannoside de méthyle (Code PDB 1KIU) d) complexé au α -D-mannopyrannoside de butyle: conformère « porte ouverte » (Code PDB 1TR7) e) et conformère « porte fermée » (Code PDB 1UWF) f) complexé à un pentasaccharide (Code PDB 2VCO).	22
Figure 1.18	Schématisation du phénomène de résistance bactérienne.	23
Figure 2.1	Surface accessible au solvant représentant les espaces libres en C-2 et C-6 du mannose (code PDB 1KLF).	25
Figure 2.2	Comparaison entre l'activité biologique du α -D-mannopyrannoside d'allyle et du α -D-mannopyrannoside de propyle.	27
Figure 2.3	Modélisation moléculaire des interactions entre le FimH et a) ManOAll b) ManOPr.	27
Figure 2.4	Principe de substitution d'une molécule d'eau conservée par un	

	groupement hydroxyle (tiré directement de l'article de Boons).	39
Figure 2.5	Comparaison entre l'activité biologique du α -D-mannopyrannoside de méthyle et du α -D-mannopyrannoside d'allyle.	52
Figure 2.6	Modélisation moléculaire des interactions entre le FimH et a) MeMan b) ManOAll.	53
Figure 3.1	Les forces fondamentales selon la théorie du Tout.	68
Figure 3.2	Comparaison de différents logiciels en modélisation moléculaire. ^a Récepteur flexible localement seulement. Les logiciels dans le haut de la pyramide ne sont pas nécessairement les plus performants. Les 3 logiciels faisant partie du <i>top 4</i> des meilleurs logiciels selon Moitessier sont écrits en rouge.	73
Figure 3.3	Minimisation de l'énergie vers le minimum global ou local.	75
Figure 3.4	Les différents modes d'arrimage moléculaire de FITTED 2.5 et les paramètres tenus en compte.	75
Figure 3.5	a) Génération de la cavité du site d'interaction par ProCESS b) Génération des Pharmacophores par ProCESS: les donneurs de ponts hydrogène sont représentés en rouge, les accepteurs en bleu et les hydrophobes en vert.	78
Figure 3.6	Les différents paramètres du fichier <i>luwf_flex.txt</i> pour ProCESS 2.5.	80
Figure 3.7	Les fichiers d'entrée et de sortie de ProCESS 2.5.	81
Figure 3.8	Les fichiers d'entrée et de sortie de SMART 2.5.	82
Figure 3.9	Les étapes de l'algorithme génétique de FITTED 2.5.	83
Figure 3.10	Les fichiers d'entrée et de sortie de FITTED 2.5.	84
Figure 3.11	Les différents paramètres du fichier <i>luwf_flex.txt</i> pour FITTED 2.5.	85
Figure 3.12	Graphique d'un modèle QSAR idéal.	88
Figure 3.13	Fenêtre de lancement de l'algorithme génétique QuaSAR-Evolution - RSI 2004.10.01 utilisé avec le logiciel MOE pour déterminer l'équation du modèle QSAR.	92
Figure 3.14	Équation simplifiée du modèle QSAR et détail des variables (descripteurs moléculaires) utilisées.	93

Figure 3.15	Graphique représentant les données de l'ensemble d'entraînement du modèle QSAR.	94
Figure 3.16	Arrimage moléculaire de l'amine 171 et de l'acide carboxylique 172 au FimH.	109
Figure 3.17	Surface accessible au solvant (Connolly) représentant le potentiel électrostatique du complexe FimH-mannose (charges positives rouges, négatives bleues, neutres blanches). L'isoleucine 13 n'a pas été représentée par souci de clarté.	110
Figure 3.18	Arrimage moléculaire du sulfate 74 et du phosphate 79 au FimH.	112
Figure 4.1	Schématisation des trois types de galectines: a) homodimère (ou proto) b) hétérodimère (ou tandem répété) c) type chimère.	115
Figure 4.2	Interactions π -cation entre Arg144 et le dérivé tétrafluorobenzamido du LacNAc (code PDB 1KJR).	116
Figure 4.3	hGal-3 complexée avec: a) 3 molécules d'eau (code PDB 2NMO) b) le lactose (code PDB 2NN8) c) le LacNAc (code PDB 1KJL) d) le 3'-(4-méthoxy-2,3,5,6-tétrafluorobenzamido)-N-acétyllactosamine ou LacNAcBEK (code PDB 1KJR).	117
Figure 4.4	Lactose complexé avec: a) hGal-1 (code PDB 1GZW) b) hGal-2 (code PDB 1HLC) c) hGal-3 (code PDB 2NN8) d) hGal-7 (code PDB 4GAL) e) hGal-8 (code PDB 2YXS) f) hGal-9 (code PDB 2EAK).	118
Figure 4.5	Alignement des six acides aminés conservés chez différentes galectines humaines.	120
Figure 4.6	Interactions CH- π entre le tryptophane chez les galectines humaines et a) un β -galactose (code PDB 1KJL) b) un β -mannose. Ces interactions se font à une distance d'environ 3Å.	120

Figure 4.7	Tétramère de la PA-IL avec ses ions Ca^{2+} (code PDB 1OKO).	121
Figure 4.8	Modélisation des interactions entre PA-IL et le D-galactose (code PDB 1OKO).	123
Figure 4.9	Modélisation des interactions entre PA-IL et l'acide (<i>E</i>)-2-benzène-4- (β -D-galactopyrannosyl)-but-2-énique 173.	124
Figure 4.10	Modélisation des interactions entre PA-IL (surfaces de Connolly) et l'acide (<i>E</i>)-2-benzène-4-(β -D-galactopyrannosyl)-but-2-énique.	126
Figure 4.11	Structure rayons-X du tris(<i>N,N</i> -diéthyl)-trimésamide.	126
Figure 4.12	Structure bidimensionnelle du glycodendrimère 177.	127
Figure 4.13	Modèle moléculaire du glycodendrimère 177 construit à partir: a) d'un cœur complètement planaire b) du cœur trimésamide.	129
Figure 4.14	Simulation de complexes a) monovalent b) divalent et c) hexavalent entre le glycodendrimère 177 et la PA-IL tétramérique obtenus par modélisation moléculaire.	130

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1	Comparaison des ponts hydrogène entre différentes lectines et des unités mannose principales. ^a Interactions avec la chaîne principale de la protéine.	13
Tableau 1.2	Comparaison des interactions entre différents complexes du FimH. ^a Pont hydrogène indirectement <i>via</i> une molécule d'eau. ^b En supposant que OH-2, OH-4 et O-5 sont remplacés par 3 molécules d'eau.	20
Tableau 2.1	Optimisation des conditions de 4,6- <i>O</i> -benzylidénation sélective du MeMan.	30
Tableau 2.2	Conditions de 2- <i>O</i> -alkylation des mannopyrannosides 26, 27, 28 et 29.	35
Tableau 2.3	Conditions d'hydrogénolyse des mannopyrannosides 33, 34, 35 et 36.	36
Tableau 2.4	Formules reliant les paramètres thermodynamiques à la constante de dissociation (K_d).	40
Tableau 2.5	Réactivité relative des alcools du D-glucose, D-galactose et D-mannose.	45
Tableau 3.1	Énergies, distances et angles types de différents ponts hydrogènes.	70
Tableau 3.2	Exemples types d'interactions arène-arène.	71
Tableau 3.4	Conversion des noms des atomes de FITTED vers MOE.	87
Tableau 3.5	Activités biologiques (K_d) expérimentales et prédites pour les 81 mannopyrannosides synthétisés (70 par Mohamed Touaibia au sein du laboratoire Roy et 11 par Julie Bouckaert et son équipe) et testés sur lequel le modèle QSAR est basé.	95
Tableau 3.6	Activités biologiques (K_d) prédites (ou testées) pour les 12 mannopyrannosides synthétisés: Les flèches (↑) ou (↓) indiquent si la valeur de K_d est augmentée ou diminuée par rapport à la référence (MeMan ou ManOAll). ^a Molécule synthétisée par Milan Bergeron-Brlek. ^b Molécule non-synthétisée.	106
Tableau 3.7	Distance entre les atomes d'azote et d'oxygène chargés pour différents ligands dont la structure du complexe a été minimisée à l'aide de FITTED 2.5.	111

Tableau 4.1	Comparaison des interactions conservées de différents complexes de hGal. ^a Pas de H ₂ O présent dans le fichier PDB (résolution de 2,90 Å). ^b Pont hydrogène indirectement <i>via</i> une molécule d'eau.	119
Tableau 4.2	Interactions du D-galactose et du dérivé acide 173 avec le PA-IL. ^a En incluant les acides aminés complexés à l'ion calcium. ^b Pont hydrogène indirectement <i>via</i> une molécule d'eau.	122
Tableau 4.3	Comparaison des activités biologiques de différents dérivés galactosyles.	125

LISTE DES SCHÉMAS

Schéma 2.1	Stratégie générale de modification de l'alcool en C-2 d'un mannopyrannoside.	26
Schéma 2.2	Conditions de 4,6- <i>O</i> -benzylidénation sélective du mannopyrannoside 9.	28
Schéma 2.3	Formation de benzylidène sur un glucopyrannoside, un galactopyrannoside et un mannopyrannoside.	29
Schéma 2.4	Benzyldénation du MeMan sans contrôle de température.	30
Schéma 2.5	2,3- <i>O</i> -débenzyldénation sélective du mannopyrannoside 21.	31
Schéma 2.6	Mécanisme de 4,6- <i>O</i> -benzyldénation sélective du MeMan.	32
Schéma 2.7	Mécanisme de 3- <i>O</i> -benzylation sélective du mannopyrannoside 10.	33
Schéma 2.8	Conditions de stannylidénation du mannopyrannoside 10.	33
Schéma 2.9	Conditions de 3- <i>O</i> -benzylation sélective du mannopyrannoside 23.	34
Schéma 2.10	Conditions générales de 2- <i>O</i> -alkylation du mannopyrannoside 24.	34
Schéma 2.11	Mécanisme de 2- <i>O</i> -propylation du mannopyrannoside 24.	34
Schéma 2.12	Voie alternative à la 2- <i>O</i> -isopropylation.	36
Schéma 2.13	Conditions générales d'hydrogénolyse.	36
Schéma 2.14	Conditions d'oxydation sélective du mannopyrannoside 33.	37
Schéma 2.15	Mécanisme d'oxydation d'un alcool primaire en acide carboxylique avec TEMPO en présence de BAIB.	38
Schéma 2.16	Conditions d'allylation du mannopyrannoside 24.	40
Schéma 2.17	Conditions d'ozonolyse du mannopyrannoside 38.	41
Schéma 2.18	Parachèvement en milieu réducteur du mannopyrannoside 39.	41
Schéma 2.19	Conditions d'hydrogénolyse du mannopyrannoside 40.	41
Schéma 2.20	Mécanisme d'ozonolyse d'un groupement <i>O</i> -allyle.	42

Schéma 2.21	Stratégie générale de désoxyfluoration de l'alcool en C-2.	43
Schéma 2.22	Conditions de glycosidation de Fischer du glucopyrannoside 48.	43
Schéma 2.23	Conditions de 4,6- <i>O</i> -benzylidénation du glycoside 42.	44
Schéma 2.24	Conditions de 3- <i>O</i> -benzoylation sélective du glucopyrannoside 49.	44
Schéma 2.25	Conditions de désoxyfluoration du glucopyrannoside 50.	46
Schéma 2.26	Conditions de déprotection du mannopyrannoside 51.	46
Schéma 2.27	Mécanisme de 4,6- <i>O</i> -débenzylidénation du mannopyrannoside 51.	47
Schéma 2.28	Stratégie générale de modification de l'alcool en C-6 d'un mannopyrannoside.	48
Schéma 2.29	Conditions de silylation sélective du mannopyrannoside 58.	48
Schéma 2.30	Conditions de tri- <i>O</i> -benzoylation du mannopyrannoside 59.	49
Schéma 2.31	Condition de désilylation du mannopyrannoside 60.	49
Schéma 2.32	Conditions de sulfatation du mannopyrannoside 61.	49
Schéma 2.33	Conditions d'hydrogénolyse du mannopyrannoside 62.	50
Schéma 2.34	Conditions de diéthylphosphatation du mannopyrannoside 61.	50
Schéma 2.35	Conditions d'hydrolyse du mannopyrannoside 65.	50
Schéma 2.36	Mécanisme de désalkylation de groupements éthyle.	51
Schéma 2.37	Conditions d'hydrogénolyse du mannopyrannoside 65.	51
Schéma 2.38	Voie alternative à la silylation en C-6 du MeMan.	52
Schéma 2.39	Conditions de glycosidation de Fischer du mannopyrannoside 68.	54
Schéma 2.40	Étapes de la glycosidation de Fischer du mannopyrannoside 68.	54
Schéma 2.41	Effet anomérique d'un D-mannopyrannoside.	55
Schéma 2.42	Mécanisme de désacétylation dans les conditions de Zemplén.	55

Schéma 2.43	Conditions de silylation du mannopyrannoside 7.	56
Schéma 2.44	Conditions d'acétylation du mannopyrannoside 69.	57
Schéma 2.45	Mécanisme d'acétylation avec Ac_2O et DMAP dans la pyridine.	57
Schéma 2.46	Mécanisme de désilylation au TBAF suivi de migration d'acétyle.	58
Schéma 2.47	Différence de réactivité entre les groupements acétyles et benzoyles.	59
Schéma 2.48	Conditions de benzylation du mannopyrannoside 60.	59
Schéma 2.49	Conditions de désilylation du mannopyrannoside 71.	60
Schéma 2.50	Conditions de sulfatation du mannopyrannoside 72.	60
Schéma 2.51	Conditions d'hydrogénolyse du mannopyrannoside 73.	60
Schéma 2.52	Conditions de diéthylphosphatation du mannopyrannoside 74.	60
Schéma 2.53	Hydrolyse souhaitée du mannopyrannoside 75.	61
Schéma 2.54	Hydrolyse réelle du mannopyrannoside 75.	61
Schéma 2.55	Conditions de glycosidation de Fischer du mannopyrannoside 77.	61
Schéma 2.56	Conditions de déprotection du mannopyrannoside 78.	61
Schéma 2.57	Conditions de désoxygénation-iodation du mannopyrannoside 7.	62
Schéma 2.58	Mécanisme de désoxygénation-iodation d'un alcool primaire.	62
Schéma 2.59	Conditions de désiodation radicalaire du rhamnoside 80.	63
Schéma 2.60	Mécanisme de désiodation radicalaire.	63
Schéma 2.61	Conditions de 2,3:4,6-di- <i>O</i> -isopropylidénation du mannopyrannoside 7.	64
Schéma 2.62	Conditions de désisopropylidénation sélective du mannopyrannoside 82.	64
Schéma 2.63	Conditions de désoxymonofluoruration du mannopyrannoside 83.	64
Schéma 2.64	Mécanisme de désoxyfluoruration d'un alcool primaire avec le DAST.	65
Schéma 2.65	Mécanisme de dégradation du DAST avec l'eau.	65

Schéma 2.66	Conditions de désisopropyldénation du rhamnoside 84.	65
Schéma 2.67	Oxydation de Swern sur le mannopyrannoside 7.	66
Schéma 2.68	Désoxydifluoration du mannopyrannoside 85.	66
Schéma 2.69	Oxydation avec TEMPO du mannopyrannoside 7.	66
Schéma 2.70	Désoxytrifluoration du mannopyrannoside 88.	67

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

Å	angström
α	alpha
a.a.	acide aminé
Ac	acétyle
AcOH	acide acétique
Ac ₂ O	anhydride acétique
AcCl	chlorure d'acétyle
AcOEt	acétate d'éthyle
AIBN	<i>N,N'</i> -azobisisobutyronitrile
AlIBr	bromure d'allyle
AlIOH	alcool allylique
Arg	arginine
aq.	aqueux
arom.	aromatique
Asp	aspartate
Asn	asparagine
ATP	adénosine triphosphate
ax.	axial
β	bêta
BAIB	bisacétoxyiodobenzène
BF ₃ •Et ₂ O	étherate de trifluorure de bore
Bn	benzyle
BnBr	bromure de benzyle
Bn(OMe) ₂	benzaldéhyde diméthyl acétal
BPP-LED	<i>BiPolar Pulse pairs-Longitudinal-Eddy-current Delay</i>
BuMan	α -D-mannopyrannoside de butyle
Bu ₂ SnO	oxyde de dibutylétain

Bu ₃ SnH	hydrure de tributylétain
BzCl	chlorure de benzoyle
Bz	benzoyle
<i>c</i>	concentration
C	carbone
cat.	catalytique (quantité)
CCM	chromatographie sur couche mince
CHCl ₃	chloroforme
cm	centimètre
Con A	Concanavaline A
COSY	<i>CORrelated SpectroscopY</i>
Cp	ion cyclopentadinényle
CPU	<i>Central Processing Unit</i> (unité centrale de traitement ou processeur)
CRD	<i>Carbohydrate Recognition Domain</i> (domaine de reconnaissance pour les sucres)
CSA	acide camphosulfonique
CuCl ₂	chlorure de cuivre(II)
CV-N	CyanoVirine-N
Cys	cystéine
D	deutérium
DAST	diéthylamino trifluorure de soufre
DCM	dichlorométhane
DMAP	4- <i>N,N</i> -diméthylaminopyridine
DME	diméthoxyéther
DMF	<i>N,N</i> -Diméthylformamide
DMP	2,2-diméthoxypropane
DMSO	diméthylsulfoxyde
dr	ratio diastéréomérique

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	acide éthylènediaminetétraacétique
ee	excès énantiomérique
ELLA	<i>Enzyme-Like Lectin Assay</i>
EP	éther de pétrole (fraction 35-60°C)
Et	éthyle
EtBr	bromure d'éthyle
EtOAc	acétate d'éthyle
EtOH	éthanol
Et ₂ O	éther diéthylique
éq.	équatorial
équiv.	équivalent
Et ₃ N	triéthylamine
FITTED	<i>Flexibility Induced Through Evolutionary Description</i> (logiciel)
Fuc	fucose

g	gramme
GA	algorithme génétique
Gal	D-galactose
Glc	D-glucose
Gln	glutamine
Glu	glutamate
GNA	<i>Galanthus Nivalis Agglutinin</i>
GP	groupe protecteur
GRFT	<i>GRiFfiThsin</i>
<i>gt</i>	configuration <i>gauche-trans</i>
H	hydrogène
h	heure
H ₂	dihydrogène
H ₂ O	eau
H ₂ SO ₄	acide sulfurique
HBF ₄	acide tétrafluoroborique
HBr	acide bromhydrique (bromure d'hydrogène)
HCl	acide chlorhydrique (chlorure d'hydrogène)
HF	acide fluorhydrique (fluorure d'hydrogène)
hGal	galectine humaine
His	histidine
hMBP	<i>Human Mannose Binding Protein</i>
HPLC	chromatographie liquide à haute performance

I_2	diiode
IC_{50}	concentration en inhibiteur provoquant 50% d'inhibition
im	imidazole
<i>i</i> -Pr	isopropyle
<i>i</i> -PrBr	bromure d'isopropyle
IR	infrarouge
ITC	<i>Isothermal Titration Calorimetry</i>

K	degrés Kelvin
K_a	constante d'affinité
kcal/mol	kilocalorie par mole
K_d	constante de dissociation
$KHSO_4$	hydrogénosulfate de potassium
kJ/mol	kilojoule par mole
K_2CO_3	carbonate de potassium

Lac	lactose
LacNAc	<i>N</i> -acétyllactosamine
Litt.	littérature
Lys	lysine

M	molarité, concentration (mol/L)
MBP	<i>Mannose Binding Protein</i> (protéines interagissant avec le mannose)
Me	méthyle
MeMan	α -D-mannopyrannoside de méthyle
MeCN	acétonitrile
MeI	iodométhane
MeOH	méthanol
mg	milligramme
MHz	mégahertz
min	minute
mL	millilitre
mm	millimètre
M _M	masse molaire moléculaire
mmol	millimole
MNL	<i>Morus Nigra Lectin</i>
mol	mole
MOE	<i>Molecular Operating Environment</i> (logiciel)
MS (ESI)	<i>Masse Spectrometry (ElectroSpray Ionization)</i>
m/z	rapport masse/charge
MVL	<i>Microcystis Viridis Lectin</i>
MW	<i>MicroWave</i> (micro-ondes)
NaCl	chlorure de sodium
NaH	hydruure de sodium
NaHCO ₃	bicarbonate de sodium
NaOMe	méthanolate de sodium
Na ₂ SO ₄	sulfate de sodium
Nbre	nombre
NH ₄ Cl	chlorure d'ammonium
nm	nanomètre

nM	nanomolaire
NPL	<i>Narcissus Pseudonarcissus Lectin</i>
O ₃	ozone
OTf	<i>O</i> -triflate (trifluorométhanesulfonate)
OTr	<i>O</i> -trityle (triphénylméthane)
OTs	<i>O</i> -tosylate (paratoluènesulfonate)
PA-IL	<i>Pseudomonas Aeruginosa Lectin I</i>
Pd/C	palladium sur charbon actif
Pd(OH) ₂ /C	dihydroxyde de palladium sur charbon actif
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PFG-STE	<i>Pulsed-Field-Gradient STimulated Echo</i>
Ph	phényle
PhCHO	benzaldéhyde
pKa	-log ₁₀ de la constante d'acidité
PLS	<i>Partial Least Square</i> (moindres carrés partiels)
POCl(OEt) ₂	chlorure de diéthylphosphate
Pont H	pont hydrogène ou liaison hydrogène
PPh ₃	triphénylphosphine
ppm	partie par million
Pr	propyle
PrBr	bromure de propyle
PrI	iodure de propyle
ProCESS	<i>Protein Conformational Ensemble System Setup</i> (logiciel)
<i>p</i> TsOH	acide paratoluènesulfonique
Pyr.	pyridine
quant.	quantitatif
QSAR	<i>Quantitative Structure-Activity Relationship</i>
QSPR	<i>Quantitative Structure-Property Relationship</i>

rend.	rendement
R _f	facteur de rétention
Rha	rhamnose
RMN	résonance magnétique nucléaire
Sat.	saturé
Ser	sérine
SCL	<i>Scilla Campanulata Lectin</i>
SIDA	syndrome d'immunodéficience acquise
SMART	<i>Small Molecule Atomtyping Rotable Torsion</i> (logiciel)
SMILES	<i>Simplified Molecular Input Line Entry Specification</i>
S _N 2	substitution nucléophile bimoléculaire
SO ₃ •Et ₃ N	complexe trioxyde de soufre-triéthylamine
SO ₃ •Pyr	complexe trioxyde de soufre-pyridine
SVL	<i>Scientific Vector Language</i> (langage de programmation)

TBAI	iodure de tétrabutylammonium
TBAF	fluorure de tétrabutylammonium
TBDPSCI	chlorure de <i>tert</i> -butyldiphénylsilyle
<i>t</i> -Bu	<i>tert</i> -butyle
T _{éb.}	température d'ébullition
TEMPO	2,2,6,6-tétraméthylpipéridine-1-oxyle
<i>tg</i>	configuration <i>trans-gauche</i>
T _{fus.}	température de fusion
TFA	acide trifluoroacétique
Tf ₂ O	anhydride trifluorométhanesulfonique
TfOH	acide trifluorométhanesulfonique
THF	tétrahydrofurane
Thr	thréonine
TMSCl	chlorure de triméthylsilyle
TMSI	iodure de triméthylsilyl
t.p.	température pièce (soit environ 25°C)
Tol.	toluène
Trp	tryptophane
Tyr	tyrosine
μL	microlitre
μM	micromolaire
UPEC	souches d' <i>Escherichia coli</i> uropathogènes
UTI	<i>Urinary Tract Infections</i> (infections du tractus urinaire)
UV	ultraviolet

VIH virus d'immunodéficience humaine

W Watt

RÉSUMÉ

La résistance bactérienne aux antibiotiques est l'un des problèmes préoccupants auquel la médecine moderne doit faire face de nos jours. Il est certain que la découverte de nouvelles familles d'antibiotiques pourrait venir à bout des souches de bactéries multirésistantes, mais pour combien de temps? Une nouvelle approche thérapeutique prometteuse apporte une solution simple et efficace à cette question en mettant de l'avant des médicaments qui empêchent l'adhésion cellulaire. D'autant plus, il se trouve que la protéine FimH des pili d'adhésion (une adhésine), chez la grande majorité des souches d'*E. coli* uropathogènes, possède une affinité sélective pour les dérivés mannopyrannosides. En observant les structures tridimensionnelles de complexes FimH-mannopyrannoside, on remarque trois positions potentiellement modifiables: C-1 qui pointe vers l'extérieur du site d'interaction, C-2 où l'on retrouve un petit espace de forme allongée et C-6 où il y a un petit volume très court et quand même large. L'objectif est donc de synthétiser de nouveaux mannopyrannosides dans le but d'en augmenter l'affinité avec le FimH, en ajoutant ou supprimant des groupes fonctionnels aux positions C-2 et C-6. La modification de groupes en C-1 a déjà été largement explorée au sein du laboratoire Roy, en grande partie par le docteur Mohamed Touaibia. Ainsi, la synthèse au laboratoire a mené d'abord à une série d' α -D-mannopyrannosides de méthyle *O*-alkylés en C-2. Par la suite, deux séries ont été synthétisées: les α -D-mannopyrannosides de méthyle, puis des α -D-mannopyrannosides d'allyle, toutes deux ayant des groupements sulfates ou phosphates en C-6. Une dernière série, les α -D-rhamnopyrannosides d'allyle qui portent soit un atome d'hydrogène ou de fluor à la place de l'alcool en C-6. En cours de route, a été également synthétisé un α -D-mannopyrannoside d'allyle fluoré en C-2. D'un autre côté, la modélisation moléculaire comme outil de visualisation et de prédiction des interactions protéine-ligand a permis d'établir un modèle de relation quantitative entre la structure et l'activité (QSAR) de différents mannopyrannosides. Les tests biologiques d'inhibition permettent d'évaluer l'efficacité réelle des ligands en donnant la valeur de constante de dissociation (K_d). Finalement, l'étude *in silico* des interactions protéine-ligand aide l'orientation de la synthèse de nouveaux mannopyrannosides qui possèdent un potentiel inhibiteur de l'adhésine FimH chez *E. coli*, et ce, tout en écartant la possibilité de développement de résistance aux antibiotiques.

Mots-clefs: algorithme génétique, D-mannose, *Escherichia coli*, FimH, infections urinaires, interactions protéine-sucre, QSAR, résistance bactérienne aux antibiotiques.

CHAPITRE I INTRODUCTION

1.1 L'IMPORTANCE DES SUCRES DANS LA NATURE

Dans la nature, la matière s'organise en des structures de divers niveaux de complexité. Les quarks forment les protons et neutrons, qui avec les électrons, forment les atomes, les atomes forment des molécules, les molécules organiques forment des cellules, les cellules forment des organes, les organes des organismes, etc. La vie est en fait le plus haut niveau de complexité de la matière.

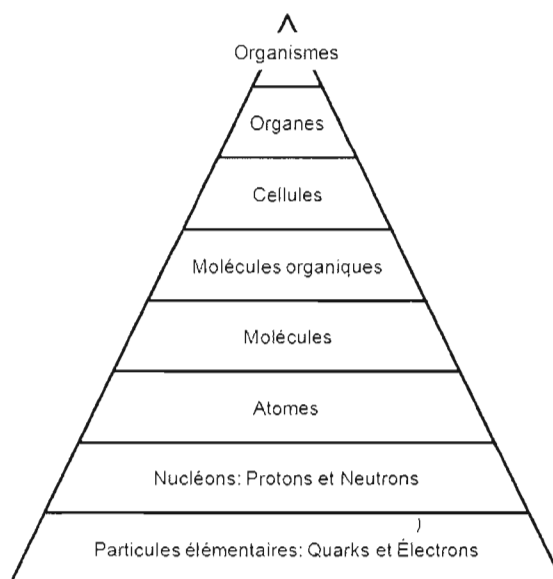


Figure 1. La pyramide de la complexité de la vie.¹

D'une manière un peu simpliste, les molécules organiques, blocs élémentaires essentiels à la vie, seraient au nombre de 68. Ces dernières sont divisées en quatre catégories: les 8 nucléosides (qui forment l'ADN et l'ARN), les 20 acides aminés (qui forment les protéines), les 8 classes de lipides ainsi que les 32 classes de glycanes.

¹ Reeves, H., *L'heure de s'enivrer*, Seuil, 1986, 290 pages

Nucleic Acids
(DNA and RNA)



Glycans

Proteins



Lipids

Figure 1.2 Les 68 molécules de la vie divisées en 4 catégories: les nucléosides, les acides aminés, les lipides et les glycanes.²

Les glycanes regroupent les saccharides, les glycoconjugués, les glycoprotéines, les glycolipides et les protéoglycanes. Toutes ces classes de glycanes sont composées d'unités saccharidiques. La beauté des monosaccharides est qu'une grande complexité est engendrée avec un petit nombre d'atomes. Si l'on prend l'exemple d'un hexopyrannose de formule moléculaire brute $C_6H_{12}O_6$, il y a 32 stéréoisomères possibles. Ce fait est encore plus flagrant lorsqu'on parle d'oligosaccharides.

Dans le cas d'un oligosaccharide pentamérique composé de cinq unités hexopyranose, 2 144 640 isomères sont possibles; alors que seulement 120 isomères d'oligopeptide ou d'oligonucléotide (également pentamériques) ne sont possibles. Cela vient d'abord du fait que les oligopeptides et oligonucléotides possèdent des structures linéaires,

² Marth, J. D., *Nat. Cell Biol.*, **2008**, 10, 1015-1016

alors que les oligosaccharides peuvent être branchés. De plus, les unités monosaccharidiques qui composent les oligosaccharides possèdent 5 stéréocentres.³

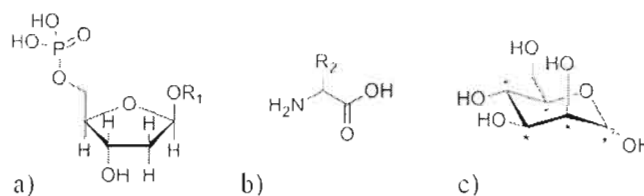


Figure 1.3 a) Structure générale d'un acide désoxyribonucléique (R_1 = base nucléique) b) Structure générale d'un acide aminé (R_2 = chaîne latérale) c) Structure du D-mannose (un représentant des hexopyranoses) et mise en évidence de ses stéréocentres.³

Par ailleurs, la réaction de formose découverte en 1861⁴ par le chimiste russe Aleksandr Butlerov permet de générer un certain niveau de complexité à partir d'une molécule bien simple: le formaldéhyde. En effet, les différentes réactions à l'équilibre catalysées par une base et un métal, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ par exemple, aboutissent au D-ribose qui possède quatre stéréocentres sous forme de pentafurannose. Comme quoi il peut-être possible que la vie aurait peut-être été générée à partir d'une molécule ne possédant aucun carbone asymétrique vers une molécule auto-répliquable qui forme de nos jours l'ARN. À l'aide de cette réaction, il est aussi possible de former des pentoses et des hexoses.

Le formaldéhyde, de formule moléculaire CH_2O , peut polymériser pour former des monosaccharides de formule générale $(\text{CH}_2\text{O})_n$ (d'où l'ancienne appellation d'hydrates de carbones) qui eux-mêmes peuvent composer des oligosaccharides de formule générale $[(\text{CH}_2\text{O})_n]_m$. De plus, cela rappelle les synthèses *de novo* de Northrup et MacMillan pour former des hexoses obtenus par deux étapes de condensation aldolique.^{5,6} À l'aide du même aldéhyde précurseur, ils ont réussi à former du D-glucose, du D-mannose et du D-allose de manière énantiosélective avec des rendements supérieurs à 79%, des dr d'au moins 10:1 et des ee d'environ 95%. Même qu'en utilisant l'énantiomère de l'organocatalyseur à la

³ Lindhorst, T. K., *Ess. Carb. Chem. Biochem.*, **2007**, pp.213-216

⁴ Butlerov, A. M., *Zeitschrift für Chemie*, **1861**, 4, 549-560 (1861)

⁵ Northrup, A. B., Magion, I. K., and MacMillan, D. W. C., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2004**, 43, 2152-2154

⁶ Northrup, A. B., and MacMillan, D. W. C., *Science*, **2004**, 305, 1752-1755

première étape, ils ont pu obtenir des L-hexoses. Au laboratoire, il est possible de générer rapidement un certain niveau de complexité contrôlée et former des sucres naturels ou non.

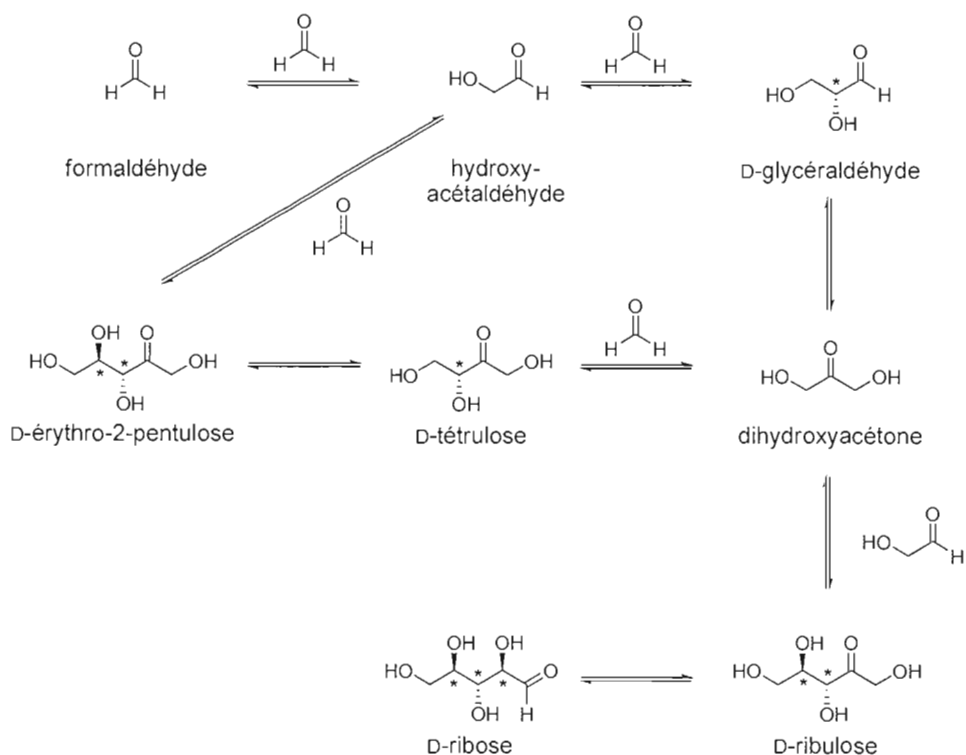


Figure 1.4 Équilibres impliqués dans la réaction de formose proposée par Breslow en 1959.⁷

Pour comprendre la vie, il a fallu d'abord décrypter l'information que recèle le code génétique. En génomique, l'alphabet de l'acide désoxyribonucléique est composé de quatre lettres: l'adénine (A), la cytosine (C), la guanine (G), et la thymine (T). Le langage génétique est en fait composé de 22 codons, c'est-à-dire 22 mots des trois lettres. Les codons se traduisent en les 20 acides aminés plus le codon *start* et le codon *stop*. Ce qui donne en protéomique l'alphabet des protéines, composé de 20 lettres: un acide aminé par lettre. Par analogie, en glycomique il y aurait « le troisième alphabet de la vie » dont le principe de

⁷ Breslow, R., *Tetrahedron Lett.*, **1959**, 21, 22-26

fonctionnement n'a pas été découvert. Selon cette théorie, le « glycode » permettrait d'expliquer la biologie des unités saccharidiques que l'on retrouve à la surface des cellules.^{8,9}

Même si l'alphabet des sucres n'existe pas encore, cela ne met pas en doute la complexité des sucres et l'importance de leur rôle en milieu biologique. Sur les 68 molécules organiques essentielles à la vie, un peu moins de 50% d'entre elles sont composées d'unités saccharidiques.³

Les sucres jouent d'abord un rôle évident au niveau du métabolisme, comme par exemple le glucose qui est une des principales sources d'énergie de notre organisme. Au niveau de la glycolyse, chaque molécule de glucose produit globalement deux molécules d'ATP par voie anaérobie ou jusqu'à 38 molécules d'ATP par voie aérobie impliquant une oxydation complète suivie du cycle de Krebs. En termes énergétique, cela fournit à l'organisme entre 120 kJ/mol et 1140 kJ/mol de glucose environ.¹⁰

Le second rôle évident des sucres est au niveau structural. Chez les plantes, la cellulose forme majoritairement la paroi cellulaire et est aussi le principal constituant du bois. La paroi cellulaire des bactéries est composée en partie de polysaccharides¹¹; tandis que celle des champignons est composée de chitine, un polymère de *N*-acétyl- β -D-glucosamine¹². La chitine est d'ailleurs une importante composante de l'exosquelette des insectes et des arthropodes tels que les crabes, les homards, les araignées, les scorpions, etc.¹³

Moins évident que précédemment, les sucres jouent un rôle important au niveau des infections¹⁴, de la réponse immunitaire¹⁵, de la différenciation cellulaire¹⁶, du développement

⁸ Seyrek, K., *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, **2004**, 28, 787-792

⁹ Niederhafner, P., Šebestík, J., and Ježek, J., *J. Pep. Sci.*, **2008**, 14, 2-43

¹⁰ Weil, J.-H., *Biochimie générale*, Chapitre 7, Dunod, Paris, (2001)

¹¹ Lichtman, S. N., Bachmann, S., Munoz, S. R., Schwab, J. H., Bender, D. E., Sartor, R. B., and Lemasters, J. J., *Infect. Imm.*, **1998**, 61, 4645-4653

¹² Raven, P. H., Evert, R. F., et Eichhorn, S. E., *Biologie végétale*, Chapitre 13, DeBoek, New-York, 2003

¹³ Claverie, I., Panet, M., et Barbeau S., *Biochimie*, p.33, Éd. Porphyre, Pays-Bas, 2008

¹⁴ Karlsson, K.-A., Angström, J., Bergström, J., and Lanne, B., *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.*, **1992**, 100, 71-83

des neurones¹⁷, de l'adhésion des bactéries, des virus et des parasites.^{18,19} Ils joueraient également un rôle important dans le cancer²⁰ et aussi dans le processus anti-inflammatoire.²¹

La reconnaissance moléculaire se définit comme étant l'association spontanée (donc favorisée thermodynamiquement) de deux molécules complémentaires. L'exemple le plus connu est probablement l'ADN, où les bases azotées (puriques et pyrimidiques) s'associent entre elles en paires (telles les paires Watson-Crick) *via* des ponts hydrogène. L'adénine (A) reconnaît donc la thymine (T) par deux ponts hydrogènes; la cytosine (C) reconnaît la guanine (G) par trois ponts hydrogène. Inversement, il n'y a pas de reconnaissance moléculaire entre les paires AC, AG, TC ou TG, ce qui est également appelé un *mismatch*.

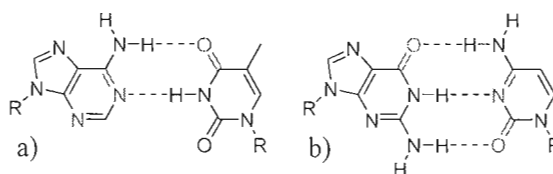


Figure 1.5 Paires de bases Watson-Crick entre a) l'adénine et la thymine b) la guanine et la cytosine. Les donneurs de ponts H sont représentés en bleu, les accepteurs en rouge.

Les mêmes principes de reconnaissance moléculaire et de complémentarité sont aussi retrouvés dans l'association entre une molécule et un ligand (tel un sucre). Souvent, des ponts hydrogènes sont impliqués et ces derniers doivent associer un donneur avec un accepteur, à une distance et un angle optimal. Mais il y a aussi des interactions avec les ions métalliques et les diverses interactions hydrophobes. Dans les livres de biochimie, la manière imagée de représenter aux étudiants l'affinité d'une protéine pour une petite molécule organique est l'analogie clef-serrure. Une protéine quelconque possède une spécificité plus ou moins large. Dans le cas de protéine spécifique à un type ligand il y a, par exemple, les serrures galectines

¹⁵ Springer, T. A., *Annu. Rev. Cell Dev. Bio.*, **1990**, 6, 359-402

¹⁶ Bremer, E. G., *Curr. Top. Membranes Transp.*, **1994**, 40, 387-41

¹⁷ Jungalwala, F. B., *Neurochem. Res.*, **1992**, 19, 945-957

¹⁸ Musser, J. H., *Annu. Rep. Med. Chem.*, **1992**, 27, 301-310

¹⁹ Schnaar, R. L., *Adv. Pharmacol.*, **1992**, 23, 35-84

²⁰ Hakomori, S., *Curr. Opin. Immunol.*, **1991**, 3, 646-653

²¹ Giannis, A., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1994**, 33, 178-180

spécifiques aux clefs galactopyrannosides, la serrure PA-IIL spécifique aux clefs fucopyrannosides, la clef FimH spécifique aux clefs mannopyrannosides, etc.

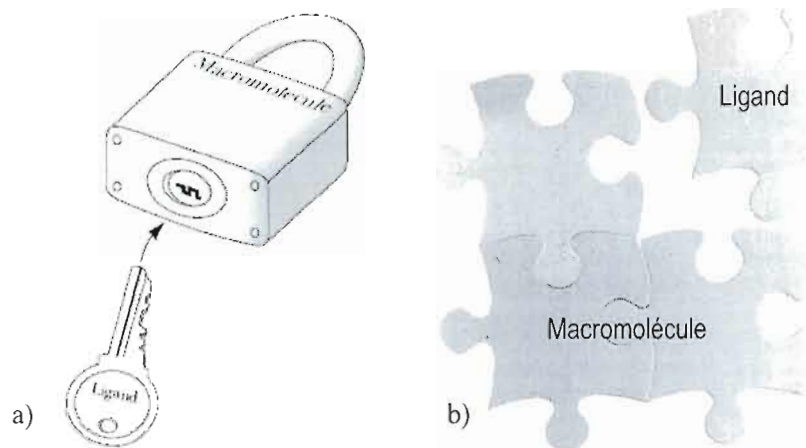


Figure 1.6 Représentations imagées des interactions protéine-ligand
a) Analogie clef-serrure b) Analogie du casse-tête

Chez les sucres, et chez les hexopyrannoses plus particulièrement, il est intéressant de voir à quel point les protéines ont évolué pour reconnaître des structures qui, à première vue très semblables, possèdent la même formule moléculaire brute. Les protéines qui reconnaissent les sucres sont donc capables de différencier chaque carbone asymétrique où les groupements hydroxyles sont orientés de manière axiale ou équatoriale. L'inverse est vrai aussi, deux protéines de familles différentes (ex: galectines vs PA-IL) peuvent reconnaître un sucre, le D-galactose par exemple, avec des interactions relativement différentes. Les protéines qui s'associent à des sucres ou leur dérivés sont appelées lectines.

Les lectines forment une superfamille de protéines qui possèdent un domaine de reconnaissance pour les sucres (CRD) et se retrouvent partout dans la nature: chez les bactéries, les champignons, les plantes, les insectes, les mammifères (dont les humains), etc. Tel que mentionné plus haut, leur spécificité est restreinte à *une seule* famille de molécules (β -glucopyrannosides, α -mannopyrannosides, β -galactopyrannosides, etc.). Leur implication dans les processus biologiques fait en sorte qu'elles sont essentielles au bon fonctionnement de l'organisme; leur dysfonctionnement étant souvent à l'origine de maladies.

1.2 LES PROTÉINES LIANT LE MANNOSE

Chez les mammifères, les cellules épithéliales exposent un large éventail de molécules glycoconjugués à leur surface. Ces structures jouent des rôles cruciaux dans plusieurs processus cellulaires importants et mettent en jeu des interactions protéine-sucre *via* un domaine de reconnaissance pour les sucres (CRD). Par conséquent, la communication cellule-cellule utilise les sucres comme signaux. Ce phénomène universel chez les êtres vivants implique des structures assez simples, au mieux des tri- ou tétrasaccharides, qui s'insèrent profondément dans le site d'interaction de la protéine, à moins d'implication d'un épitope conformationnel.²²

De plus, la grande majorité des protéines n'utilisent qu'un groupe limité de sucres très similaires entre eux, ce qui permet d'atteindre un haut degré de sélectivité. Par exemple, le système immunitaire inné chez les humains exploite la structure des mannopyrannosides comme moyen de défense contre divers agents infectieux (tels bactéries, champignons et levures) *via* les protéines interagissant avec le mannose (MBP). Jusqu'à présent, nous savons que les macrophages, les hépatocytes et les cellules dendritiques utilisent les mannopyrannosides dans la reconnaissance cellulaire ou comme activateur. Inversement, les bactéries, telles les souches d'*E. coli*, sont hérissées de pili et possèdent au bout desquels une protéine (une adhésine) vient se lier aux mannopyrannosides des tissus de l'hôte. Les bactéries possèdent les mêmes mécanismes pour infecter l'humain que l'humain pour se défendre de ces infections. Cette adhésion cellulaire est en fait la première étape du processus d'infection bactérienne.

De ce fait, le développement de nouveaux mannopyrannosides, employés seuls ou sous forme de glycopolymères ou encore de glycodendrimères,^{23,24,25,26} deviennent très utiles pour l'approche thérapeutique de demain. Ces dernières exploitent le phénomène de

²² Lis, H., and Sharon, N., *Chem. Rev.*, **1998**, 98, 637-674

²³ Roy, R., *Polymer News*, **1996**, 21, 226-232

²⁴ Turnbull, W. B., and Stoddart, J. F., *Rev. Mol. Biotechnol.*, **2002**, 90, 231-255

²⁵ Lindhorst, T. K., *Top. Curr. Chem.*, **2002**, 218, 201-235; Lindhorst, T. K., *Top. Curr. Chem.*, **2002**, 218, 201-235; Bezouška, K., *Rev. Mol. Biotechnol.*, **2002**, 90, 269-290

²⁶ Cloninger, M. J., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2002**, 6, 742-748

pour l'approche thérapeutique de demain. Ces dernières exploitent le phénomène de multivalence²⁷ et leur synthèse très flexible résulte en une infinité d'architectures. De plus, ils peuvent présenter de nombreux types de monosaccharides.^{28,29}

Dans ce présent travail, sera fait un survol des cas d'interactions protéine-sucre les plus étudiés impliquant des mannopyrannosides. Évidemment, d'autres cas importants impliquent également ce même genre d'interactions avec d'autres sucres, comme les protéines interagissant avec le galactose, telles les galectines.³⁰ L'étude des interactions entre un sucre et une protéine permet de raffiner la structure du monosaccharide en question et ultimement de pouvoir l'incorporer dans la structure d'un glycopolymère ou encore un glycodendrimère.

1.2.1 L'anticorps monoclonal humain 2G12

Découvert au début des années 1980, le VIH a causé la mort de beaucoup de personnes dans le monde jusqu'à ce jour et demeure encore parmi les maladies les plus étudiées. De l'extérieur, ce virus est formé d'une bicouche lipidique protectrice qui est parsemée d'une glycoprotéine transmembranaire (la gp41) qui elle-même est surmontée d'une seconde glycoprotéine (la gp120), tous les deux formant un trimère. Le rôle de la gp120 est en fait de trouver des récepteurs pour se fixer à la cellule cible et ainsi permettre l'injection du matériel viral dans la cellule. Pour ce faire, la gp120 expose des oligosaccharides (le Man₉GlcNAc₂) qui se lient spécifiquement à l'antigène monoclonal 2G12. Ainsi désactivé par la présence de ces oligosaccharides, le 2G12 ne peut plus communiquer avec le système immunitaire. Les personnes affectées deviennent de cette manière immunodéficientes et peuvent mourir de n'importe quelle maladie normalement anodine, telle une grippe.

²⁷ Roy, R., *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **8**, 79-99 (1996)

²⁸ Roy, R., *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2003**, 15, 291-310; Roy, R., *The Chemistry of Neoglycoconjugates*. In *Carbohydrate Chemistry*, Boons, G.-J., Ed., Blackie Academic & Professional, London, UK, 1998, pp 243-321; Roy, R., *Carbohydrate in Europe*, **1999**, 27, 34-41

²⁹ Pieters, R. J., *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **2004**, 16, 243-254

³⁰ Brewer, C. F., *Biochim. Biophys. Acta*, **2002**, 1572, 255-262; Cooper, D. N. W., *Biochim. Biophys. Acta*, **2002**, 1572, 209-231

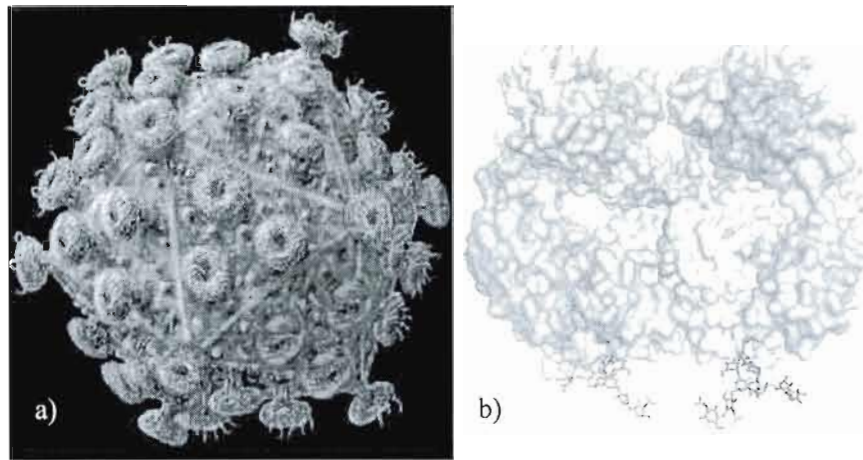


Figure 1.7 a) Virus de l'immunodéficience humaine (VIH)
b) Fab 2G12 complexée avec Man₉GlcNAc₂ (code PDB 1OP5).³¹

Les principales approches thérapeutiques de nos jours ciblent trois enzymes du virus: la transcriptase inverse, l'intégrase et la protéase. Une quatrième option est de cibler la gp120 à l'aide de lectines spécifiques aux mannopyrannosides. Par inhibition compétitive, ces dernières lectines sont préférées au 2G12 par la gp120 qui ne peut effectuer son action contre le système immunitaire.

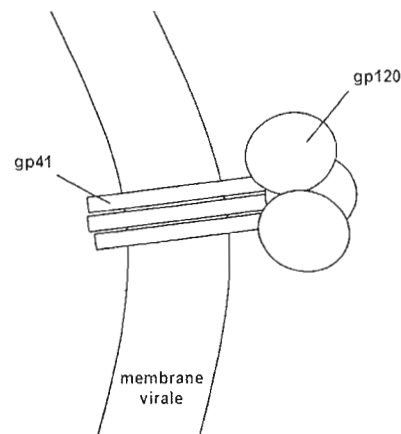


Figure 8. La glycoprotéine transmembranaire gp41 surmontée de

³¹ Calarese, D. A., Scanlan, C. N., Zwick, M. B., Deechonkit, S., Mimura, Y., Kunert R., Zhu, P., Wormald, M. R., Stanfield, R. L., Roux, K. H., Kelly, J. W., Rudd, P. M., Dwek, R. A., Katinger, H., Burton, D. R., and Wilson, I. A., *Science*, **2003**, 300, 2065-2071

la glycoprotéine gp120 formant ainsi un homotrimère.

Parmi les études sur le VIH, plusieurs études ont découvert des lectines d'origine végétale ou bactérienne qui posséderaient une excellente affinité pour la gp120.

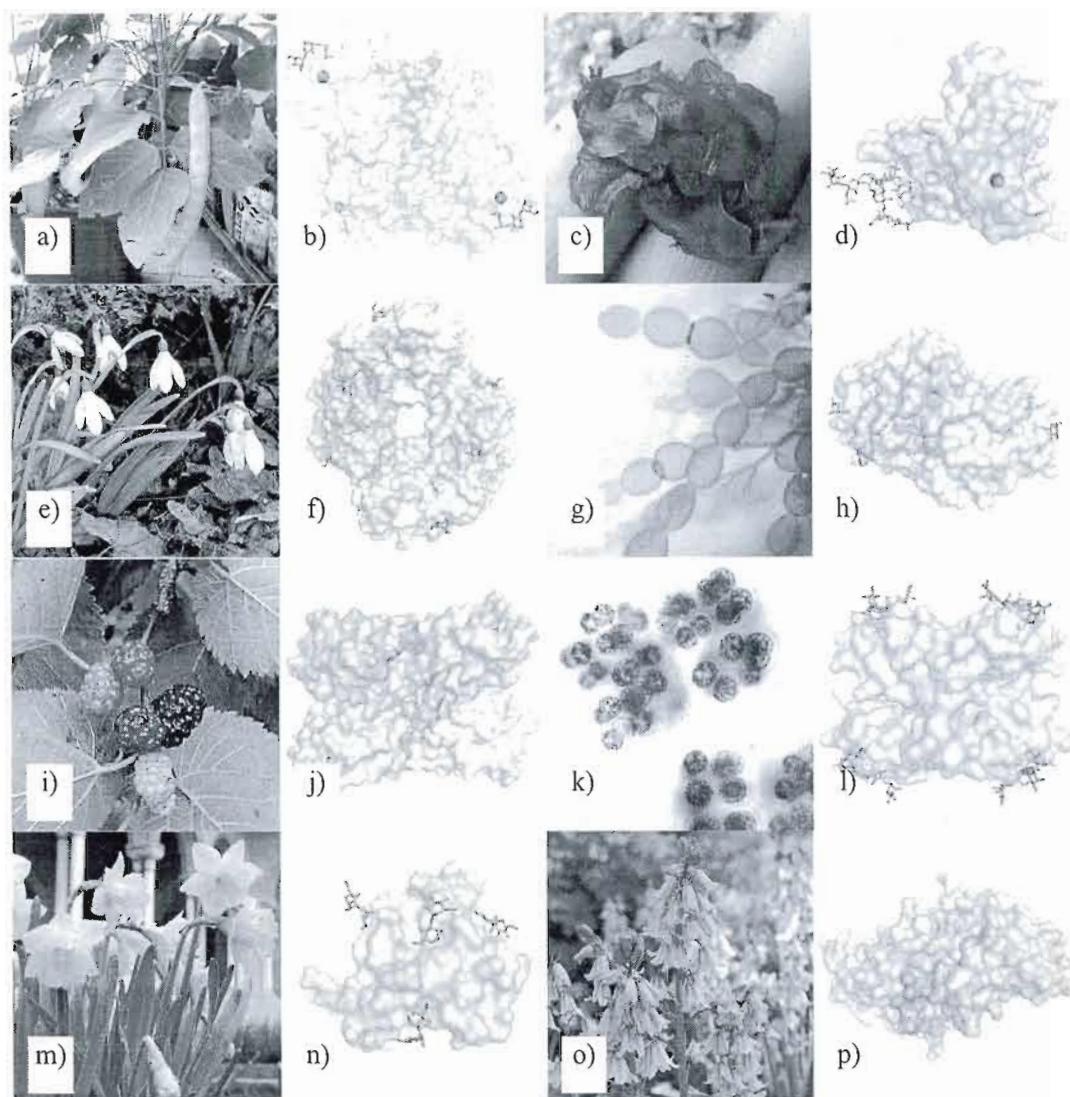


Figure 1.9 a) *Canavalia ensiformis* b) Con A complexée au mannose (code PDB 1CVN)³² c) *Nostoc ellipsosporum* d) CV-N complexée à Man-9 (code PDB 3GXZ)³³ e) *Galanthus nivalis* f) GNA complexée au MeMan (code PDB 1MSA)³⁴ g) *Griffithsia sp.* h)

³² Naismith, J. H., and Field, R. A., *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 972-976

³³ Botos, I., O'Keefe, B. R., Shenoy, S. R., Cartner, L. K., Ratner, D. M., Seeberger, P. H., Boyd, M. R., and Wlodawer, A., *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 34336-34342

³⁴ Hester, G., Kaku, H., Goldstein, I. J., and Wright, S., *Nat. Struct. Biol.*, **1995**, 2, 472-479

complexée avec D-Man (code PDB 2GUD)³⁵ i) *Morus nigra* j) MNL complexée avec D-Man (code PDB 1XXR)³⁶ k) *Microcystis viridis* l) MVL complexée avec Man₃GlcNAc₂ (code PDB 1ZHS)³⁷ m) *Narcissus pseudonarcissus* n) NPL complexée avec 3 α -mannobiose (code PDB 1NPL)³⁸ o) *Scilla campanulata* p) SCL non-complexée (code PDB 1B2P).³⁹

Plusieurs de ces structures ont été caractérisées par diffraction des rayons-X sous forme de complexe avec un ligand. Ne seront pas comparées ici les interactions de SCL, sa structure PDB apoprotéine, et MVL car leur mode de liaison n'implique pas seulement une unité de mannose, mais quatre unités saccharidiques. À la figure 8, où sont comparées les majeures interactions (pont hydrogènes), on observe quelques similitudes sur l'unité mannose principale.

Pour ce qui est des complexes avec NPL et GNA, les mêmes interactions se font avec les mêmes résidus d'acides aminés. Ce qui est attendu puisque les deux plantes font partie de la famille des amaryllidacées et partagent 84% d'homologie de la séquence au niveau des deux lectines. La superposition de leur structure tridimensionnelle se fait avec un écart d'aussi peu que 0,26 Å calculé à l'aide du logiciel MOE. Les principales interactions se font au niveau de l'hydroxyle en C-2, ce qui permet une reconnaissance sans équivoque du D-mannose *versus* le D-glucose ou le D-galactose. Cette dernière particularité n'est pas commune avec les structures restantes. NPL et GNA possèdent aussi, tous deux, la caractéristique de pouvoir complexer trois unités mannopyrannosides (par monomère de lectine) avec les 6 mêmes résidus d'acides aminés. Aucune de ces interactions ne se fait avec la chaîne principale de la lectine.

Pour les complexes avec GRFT et MNL, c'est l'hydroxyle en position C-6 qui est fortement reconnu (avec 4 et 5 ponts hydrogène respectivement). Aucune interaction ne se

³⁵ Ziolkowska, N. E., O'Keefe, B. R., Mori, T., Zhu, C., Giomarelli, B., Vojdani, F., Palmer, K. E., McMahon, J. B., and Wlodawer, A., *Structure*, 2006, 14, 1127-1135

³⁶ Rabijns, A., Barre, A., Van Damme, E. J. M., Peumans, W. J., De Ranter, C. J., and Rougé, P., *Fed. Soc. Biochem. Mol. Biol. J.*, **2005**, 272, 3725-3732

³⁷ Williams Jr., D. C., Lee, J. Y., Cai, M., Bewley, C. A., and Clore, G. M., *J. Biol. Chem.*, **2005**, 280, 29269-29276

³⁸ Sauerborn, M. K., Wright, L. M., Reynolds, C. D., Grossmann, J. G., and Rizkallah, P. J., *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274, 185-199

³⁹ Wood, S. D., Wright, L. M., Reynolds, C. D., Rizkallah, P. J., Allen, A. K., Peumans, W. J., and Van Damme, E. J. M., *Acta Cryst. Section D*, **1999**, D55, 1264-1272

fait avec le groupement alcool en C-2, ni directement avec un résidu d'acide aminé ni indirectement *via* une molécule d'eau. Ce qui veut dire que les deux lectines ne sont pas spécifiques au D-mannose, puisque leur affinité est élargie aussi au D-glucose. D'ailleurs, une structure obtenue par diffraction des rayons-X du GRFT complexé au D-glucose est disponible dans la littérature (Code PDB 2NUO).⁴⁰ Au niveau des interactions en général, il y a quand même assez de similitude entre GRFT et MNL. Un aspartate, *via* sa fonction acide carboxylique, lie à la fois les hydroxyles aux positions C-4 et C-6. Tous les autres ponts H se font avec l'amide (NH et/ou C=O) de la chaîne principale. Malgré ces fortes similarités, il n'y a pas de lien entre les espèces *Griffithsia sp.* (une cyanobactérie) et *Morus nigra* (un mûrier noir) où il n'y a pas plus de 29% d'homologie dans la séquence d'acides aminés de leur lectine.

Code PDB	3GXZ	1CVN	1NPL	1MSA	2GUD	1XXR
Lectine	CV-N	Con A	NPL	GNA	GRFT	MNL
Résolution	2,50 Å	2,30 Å	2,00 Å	2,29 Å	0,94 Å	2,00 Å
Ponts H	5	6	6	6	7	8
O-1	-	-	-	-	-	-
OH-2	-	-	Gln57 Asp59 Asn61	Gln57 Asp59 Asn61	-	-
OH-3	Asn93 ^a Asp95 ^a	Arg228 ^a	Gln57	Gln57	Gly44 ^a	Gly27 ^a
OH-4	Glu23 ^a Asp95 ^a	Asn14 Asp208	Tyr65	Tyr65	Asp30	Asp153
O-5	-	Leu99 ^a	Asn61	Asn61	Ser27 ^a	Phe150 ^a
OH-6	Glu23	Tyr100 ^a Asp208	-	-	Gly26 ^a Tyr28 ^a Tyr28 ^a Asp30	Gly149 ^a Phe150 ^a Val151 ^a Val151 ^a Asp153

Tableau 1.1 Comparaison des ponts hydrogène entre différentes lectines et des unités mannose principales. ^a Interactions avec la chaîne principale de la protéine.

⁴⁰ Ziolkowska, N. A., Shenoy, S. R., O'Keefe, B. R., and Wlodawer, A., *Prot. Sci.*, **2007**, 16, 1485-1489

Les structures CV-N et Con A montrent un peu de similarité dans les interactions avec un mannose. Pour la cyanovirine-N, les interactions majeures se font entre la chaîne principale de la protéine et les hydroxyles C-3 et C-4; alors que chez Con A, elles se font avec les hydroxyles en C-4 et C-6, dont une seule avec la chaîne principale. Pour la concanavaline A, il n'y a aucune interaction avec participation de l'oxygène endocyclique (O-5). Entre ces deux séquences, il n'y a au plus de 1% d'homologie. Tout comme pour GRFT et MNL, la concanavaline A et la cyanovirine-N ne reconnaissent pas l'hydroxyle en position C-2. Comme quoi elles seraient également des lectines non-spécifiques ayant des interactions à la fois avec le mannose et le glucose. D'ailleurs, il est mentionné dans la littérature que Con A lie très bien le D-glucose.⁴¹

Dans tous ces exemples, il y a deux points en commun: l'oxygène anomérique (O-1) n'est impliqué dans aucune interaction; aucune molécule d'eau n'est impliquée pour former des ponts hydrogènes indirects entre le mannose et la lectine. Évidemment, cette liste n'est pas exhaustive et plusieurs autres lectines antivirales spécifiques au mannose sont étudiées telles que: *Urtica dioica agglutinin* (UDA), *Myrianthus holstii lectin* (MHL), *Hippeastrum hybrid agglutinin* (HHA), *Epipactis helleborine agglutinin* (EHA), etc.

1.2.2 Protéine humaine liant le mannose

La protéine humaine liant le mannose (hMBP) fait partie de la famille des collectines et joue un rôle de première ligne dans la défense de l'hôte. Retrouvée dans le sang de divers mammifères, cette protéine provoque des réactions immunitaires contre les pathogènes indépendamment des immunoglobulines. La réponse immunitaire a lieu après seulement quelques minutes d'exposition avec les agents pathogènes, ce qui induit la production d'antigènes spécifiques après de 1 à 3 jours.⁴² La fonction principale de la hMBP est de reconnaître les oligomannoses à la surface de divers virus et bactéries. Après adhésion entre la protéine et le ligand, il y a un début de lyse ce qui aide la reconnaissance par les phagocytes, et de ce fait facilite le phénomène de phagocytose.

⁴¹ Ballerstadt, R., and Schultz, J. S., *Sensors and Actuators B*, **1998**, 46, 50-55

⁴² Epstein, J., Eichbaum, Q., Sheriff, S., and Ezekowitz, R. A. B., *Curr. Opin. Biol.*, **1996**, 8, 29-35

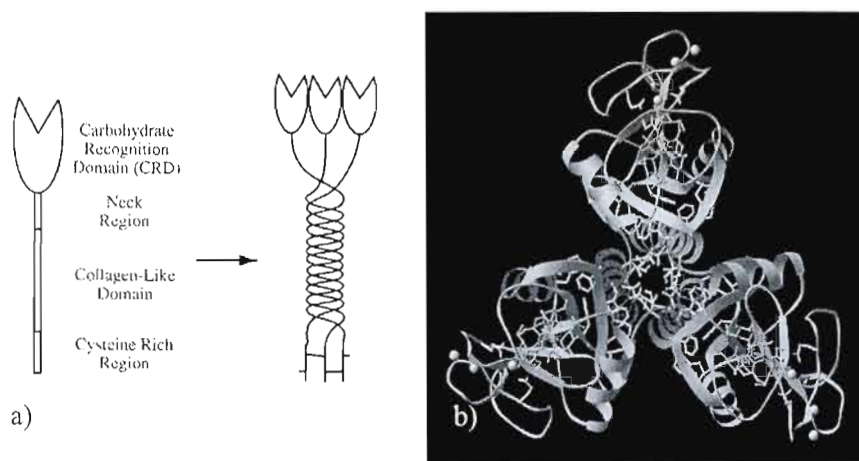


Figure 1.10 a) Structure « bouquet » d'une collectine trimérique
b) trimère de la hMBP complexée à un oligomannose (sphères jaunes = ions calcium).

La structure de la hMBP consiste en 18 sous-unités arrangées sous forme d'hexamères ou de trimères⁴³ qui adopte une conformation en forme de bouquet. Sur chacune de ces sous-unités se distinguent quatre régions: le CRD (qui est dépendant du calcium), la région du cou, une région très riche en résidus d'acides aminés glycine et proline et une région riche en cystéine (qui permet la formation de réticulation sous forme de ponts disulfures).⁴⁴ Les CRD se retrouvent regroupés et que cela facilite la reconnaissance des oligomannoses, notamment ceux à la surface des bactéries et virus.

1.2.3 Macrophages et cellules dendritiques

DC-SIGN appartient à la famille des lectine de type-C (dépendantes du calcium) qui est exprimée à la surface des cellules dendritiques et des macrophages. Cette lectine possède un domaine de reconnaissance pour les sucres (CRD) à son extrémité C-terminale et peut, tout comme les hMBP, former des oligomères (des homotétramères) afin d'exposer quatre CRD. DC-SIGN est capable de se lier aux glycoprotéines du gp120 (VIH), du gp1 (virus Ébola) et du gpE (virus de la dengue) et est donc considéré comme un important récepteur

⁴³ Kawasaki, N., Ma, B. Y., and Kawasaki, T., *Biochem. Biophys. Acta*, **1999**, 1473, 186-195

⁴⁴ Sheriff, S., Chang, C. Y. Y., and Ezekowitz, R. A. B., *Nat. Struct. Biol.*, **1994**, 1, 789-794

viral et l'inhibition des interactions avec les glycoprotéines représente une nouvelle approche thérapeutique potentielle.

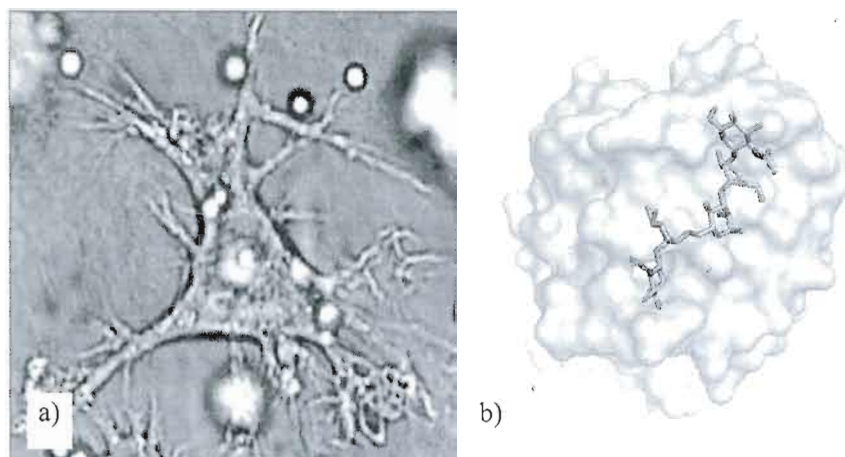


Figure 1.11 a) Cellule dendritique humaine
b) DC-SIGN complexée à GlcNAc₂Man₃ (Code PDB 1K9J)⁴⁵

1.2.4 Lectines bactériennes

Une des premières étapes de l'infection bactérienne est l'adhésion de l'agent pathogène à la cellule de l'hôte. Des lectines d'adhésion, appelée adhésines, sont exprimées à la surfaces des bactéries et l'adhésion cellulaire a lieu *via* des interactions sucre-lectine sur les glycolipides et les glycoprotéines se retrouvant à la surface des cellules. Les appendices d'adhésion les plus communs sont les pili de type I (ou fimbriae) et sont retrouvés chez différentes souches bactériennes pathogènes telles que *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* sp., *Serratia marcescens*, *Shigella flexneri* et *Escherichia coli*. Cette dernière souche, ainsi que d'autres entérobactéries, se lient spécifiquement aux résidus mannoses via une adhésine appelée FimH. Les infections urinaires causées par *E. coli* sont le sujet de la section suivante.

⁴⁵ Feinberg, H., Mitchell, D. A., Drickamer, K., and Weis, W. I., *Science*, **2001**, 94, 2163-2166

1.3 INFECTIONS DU TRACTUS URINAIRE ET *ESCHERICHIA COLI*

Faisant partie de la flore bactérienne intestinale normale, *Escherichia coli* (non-pathogène) colonise nos intestins dès les premiers jours de la naissance. Avec l'évolution naturelle, une relation de commensalisme s'est développée entre les humains et cette bactérie. *Escherichia coli* trouve donc une partie de sa nourriture dans les intestins des humains tandis que les humains n'en retirent pas de bénéfice évident. Toutefois, certaines souches d'*E. coli* ont muté pour devenir pathogènes et exposent désormais des pili d'adhésion: les souches non-pathogènes n'expriment pas cette adhésine. Ces bactéries sont à l'origine de diverses infections, telles les méningites, mais aussi les infections urinaires.

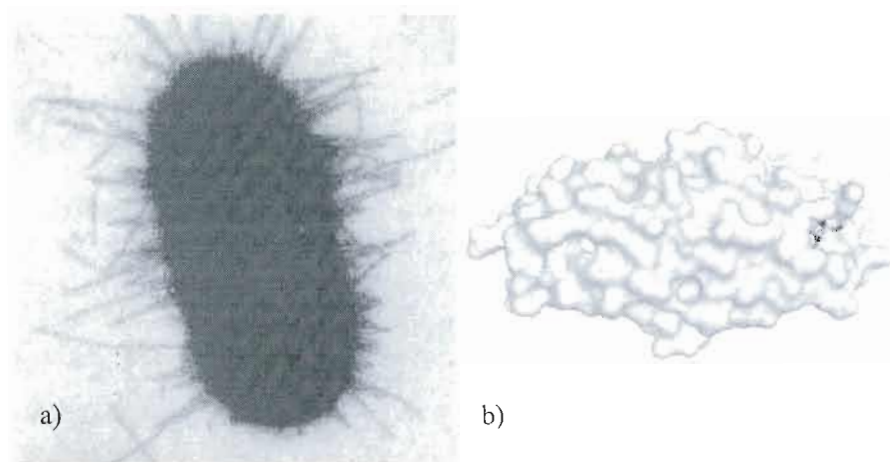


Figure 1.12 a) *Escherichia coli* uropathogène et ses pili d'adhésion

b) FimH complexé au D-mannose (Code PDB 1KIU)⁴⁶

Les souches uropathogènes d'*E. coli* expriment dans leur code génétique neuf types de protéines, soit les FimA à FimI. Les FimC et FimD servent au transport à l'assemblage des pili tandis les FimB et FimE servent à la régulation. Quant à eux, les pili d'adhésion sont en fait un assemblage de quatre types de protéines: FimA, FimF, FimG et FimH.

⁴⁶ Hung, C.-S., Bouckaert, J., Hung, D., Pinkner, J., Widberg, C., DeFusco, A., Auguste, C. G., Strouse, R., Langermann, S., Waksman, G., and Hultgren S. J., *Mol. Microbiol.*, **2002**, 44, 903-915

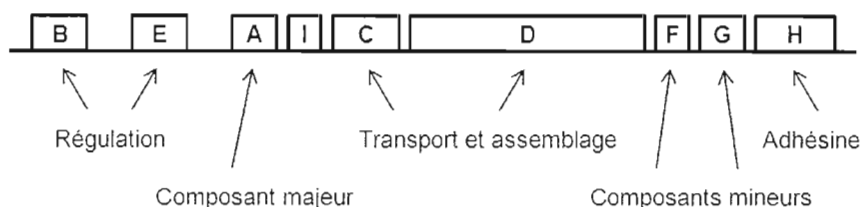


Figure 1.13 Situation relative des FimA à FimI dans la séquence ADN d'*E. coli* uropathogène.⁴⁷

Les pili sont composés en majeure partie de FimA, assemblés en forme de spirale, au nombre d'environ 500 à 3000 unités dépendamment de la souche bactérienne.⁴⁸ Dans le restant de la structure, le FimA terminal est surmonté par un FimF, lui-même surmonté par un FimG pour se terminer avec l'adhésine FimH.

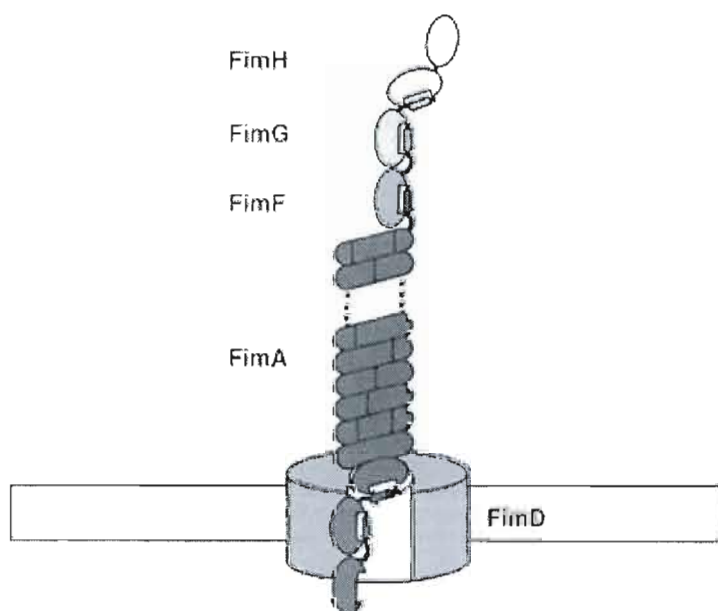


Figure 1.14 Schématisation d'un pili chez *E. coli* uropathogène: FimA est représenté en rouge, FimF en orange foncé, FimG en orange pâle et FimH en jaune.⁴⁹

⁴⁷ Krogfelt, K. A., Bergmans, H., and Klemm, P., *Infect. Imm.*, **1990**, 58, 1995-1998

⁴⁸ Nishiyama, M., Horst, R., Eidam, O., Herrmann, T., Ignatov, O., Vetsch, M., Bettendorff, P., Jelesarov, I., Grütter, M. G., Wüthrich, K., Glockshuber, R., and Capitani, G., *EMBO J.*, **2005**, 24, 2075-2086

⁴⁹ Nishiyama, M., Horst, R., Eidam, O., Herrmann, T., Ignatov, O., Vetsch, M., Bettendorff, P., Jelesarov, I., Grütter, M. G., Wüthrich, K., Glockshuber, R., and Capitani, G., *EMBO J.*, **2005**, 24, 2075-2086

La structure du FimH apoprotéine (Code PDB 1QUN) a été caractérisée par diffraction des rayons-X par Choudhury et son équipe en 1999.⁵⁰ En fait, le FimH est composé d'une séquence de 279 a.a. repliée en deux domaines (C- et N- terminaux) qui sont reliés par un petit espaceur. Le domaine N-terminal (contenant le CRD) comprend les 156 premiers résidus d'acides aminés, les 120 suivants pour le C-terminal et 4 derniers pour l'espaceur. La partie contenant le CRD se situe au bout d'un repliement de type tonneau β formé de 11 brins β allongés. Le complexe 1QUN contient 3 molécules d'eau co-cristallisée dans le CRD qui se trouvent dans l'espace où se trouveraient les groupements alcools OH-2, OH-4 et l'oxygène endocyclique des mannopyrannosides. Ces derniers forment des ponts hydrogènes avec Phe1, Asp54 et Asn 135.

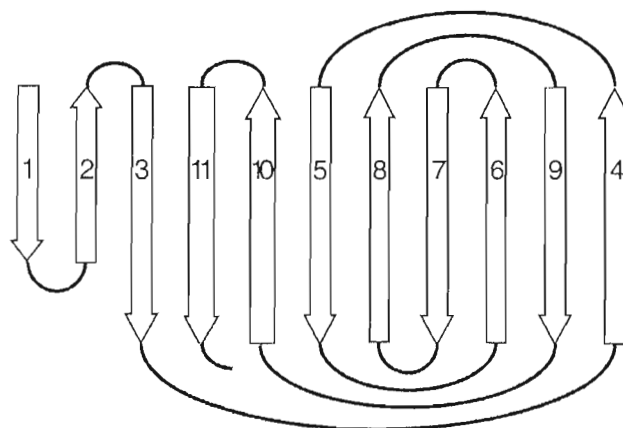


Figure 1.15 Les 11 brins β constituant la structure secondaire du FimH.⁵⁰

Par la suite, en 2002, Bouckaert et son équipe ont caractérisé par diffraction des rayons-X les complexes du FimH avec le D-mannose (Code PDB 1KLF)⁴⁶ et le MeMan (Code PDB 1KIU)⁴⁶. De cette manière, ils ont pu décrire les interactions entre l'adhésine et le FimH (tableau 2). Une des particularités de la structure 1KIU, c'est qu'il y a eu mutation de Glu133 en Asp133, soit un CH_2 en moins. Ce raccourcissement de la chaîne latérale du résidu acide aminé 133 a un effet négatif au niveau des interactions avec le mannopyrannoside. En effet, en plus de ne pas observer de pont hydrogène entre le ligand et Asn133, il y a perte d'interactions avec Asn135 et Asp140. Cette mutation a donc pour effet d'abaisser

⁵⁰ Choudhury, D., Thompson, A., Stojanoff, V., Langermann, S., Pinkner, J., Hultgren, S. J., and Knight, S. D., *Science*, **1999**, 285, 1061-1066

considérablement l'activité biologique et montre jusqu'à quel point un petit changement dans la conformation de la protéine ou, par extension, du ligand peut affecter tout le système. Dans le cas du complexe 1KLF (non-muté), tous les atomes d'oxygène du D-mannose sont mis à contribution dans des ponts hydrogène avec le FimH.

Code PDB	1QUN	1KLF	1KIU	1TR7	1UWF	2VCO
Ligand	(vide)	Man	MeMan	BuMan	BuMan	penta-saccharide
Résolution	2,80 Å	2,79 Å	3,00 Å	2,10 Å	1,69 Å	2,10 Å
Eau	3 H ₂ O	1 H ₂ O	2 H ₂ O	2 H ₂ O	2 H ₂ O	2 H ₂ O
OH-6	-	Phe1	Phe1	Phe1	Phe1	Phe1
	-	Asp47	Asp47	Asp47	Asp47	Asp47
	-	Asp54	Asp54	Asp54	Asp54	Asp54
CH ₂ -6	-	Ile52	Ile52	Ile52	Ile52	Ile52
O-5	Phe1 ^b	Phe1	Phe1	Phe1	Phe1	Phe1
OH-4	Asp54 ^b	Asp54	Asp54	Asp54	Asp54	Asp54
	Asn135 ^b	Asn135	-	Asn135	Asn135	Asn135
OH-3	-	Gln133	-	Gln133	Gln133	Gln133
	-	Asp140	-	Asp140	Asp140	Asp140
OH-2	Phe1 ^b	Phe1	Phe1 ^(a)	Phe1	Phe1	Phe1
	-	Gly14 ^a	Gly14 ^a	Gly14 ^a	Gly14 ^a	Gly14 ^a
	-	Gln133 ^a	-	Gln133 ^a	Gln133 ^a	Gln133 ^a
O-1	-	-	-	Asn138 ^a	Asn138 ^a	Asn138 ^a
	-	-	-	Asp140 ^a	Asp140 ^a	Asp140 ^a
H-1	-	Ile13	Ile13	Ile13	Ile13	Ile13
R	-	-	-	Tyr48	Tyr48	-
	-	-	-	Ile52	Ile52	-
	-	-	-	Tyr137	Tyr137	Tyr137

Tableau 1.2 Comparaison des interactions entre différents complexes du FimH.

^a Pont hydrogène indirectement *via* une molécule d'eau. ^b En supposant que OH-2, OH-4 et O-5 sont remplacés par 3 molécules d'eau.

En 2005, ont été co-cristallisées deux nouvelles structures du FimH complexé avec le BuMan par Bouckaert et son équipe.⁵¹ Les deux complexes montrent sensiblement les mêmes interactions entre la protéine et le sucre, excepté pour Tyr48. Ce résidu d'acide aminé se trouve dans deux différentes conformations soit « porte ouverte », où les deux tyrosines

⁵¹ Bouckaert, J., Berglund, J., Schembri, M., De Genst, E., Cools, L., Wuhler, M., Hung, C.-S., Pinkner, J., Slättegård, R., Zavialov, A., Choudhury, D., Langermann, S., Hultgren, S. J., Wyns, L., Klemm, P., Oscarson, S., Knight, S. D., and De Greve, H., *Mol. Microbiol.*, **2005**, 55, 441-455

sont parallèles, ou « porte fermée » où les deux tyrosines sont plutôt perpendiculaires. En fait, Tyr48 et Tyr137 forment une région hydrophobe dans le bas du site d'interaction, ce qu'on appelle la porte tyrosine. Ce changement conformationnel de la protéine en « porte fermée » amène aussi un changement conformationnel du ligand, la partie *O*-butyle vient se placer dans une conformation étendue (*full extended*) plus favorable d'un point de vue énergétique. Cet exemple extrême de flexibilité du FimH permet de faire de l'arrimage moléculaire rigide sur la structure 1UWF seulement ou bien de l'arrimage moléculaire flexible tenant compte de l'orientation de Tyr48 entre les positions « porte ouverte » et « porte fermée ».

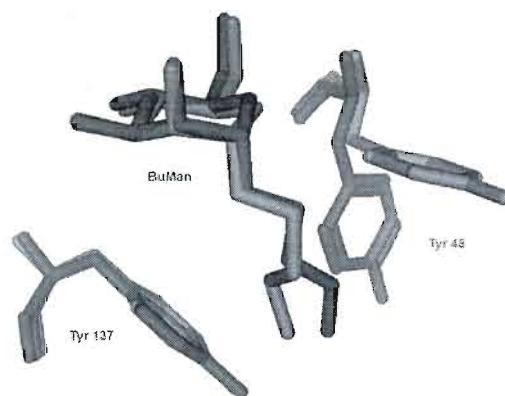


Figure 1.16 Superposition des complexes FimH-BuMan « porte ouverte » en rouge (Code PDB 1TR7) et « porte fermée » en bleu (Code PDB 1UWF).⁵²

Plus récemment, en 2008, une nouvelle structure du FimH a été cristallisée et également caractérisée par diffraction des rayons-X (Code PDB 1VCO).⁵³ Il s'agit du complexe avec un pentasaccharide, l' α -D-Man-(1 \rightarrow 3)-[α -D-Man-(1 \rightarrow 6)]- β -D-Man-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)-D-GlcNAc, où les principales interactions se font sur l'unité α -D-Man-(1 \rightarrow 3); les autres unités saccharidiques n'ayant que peu d'interactions, mais non-négligeables, avec la protéine.

⁵² Sperling, O., Fuchs, A., and Lindhorst, T. K., *Org. Biomol. Chem.*, **2006**, 4, 3913-3922

⁵³ Wellens, A., Garofalo, C., Nguyen, H., Van Gerven, N., Slättegård, R., Hernalsteens, J.-P., Wyns, L., Oscarson, S., De Greve, H., Hultgren, S., and Bouckaert, J., *Plos One*, **2008**, 3, E2040

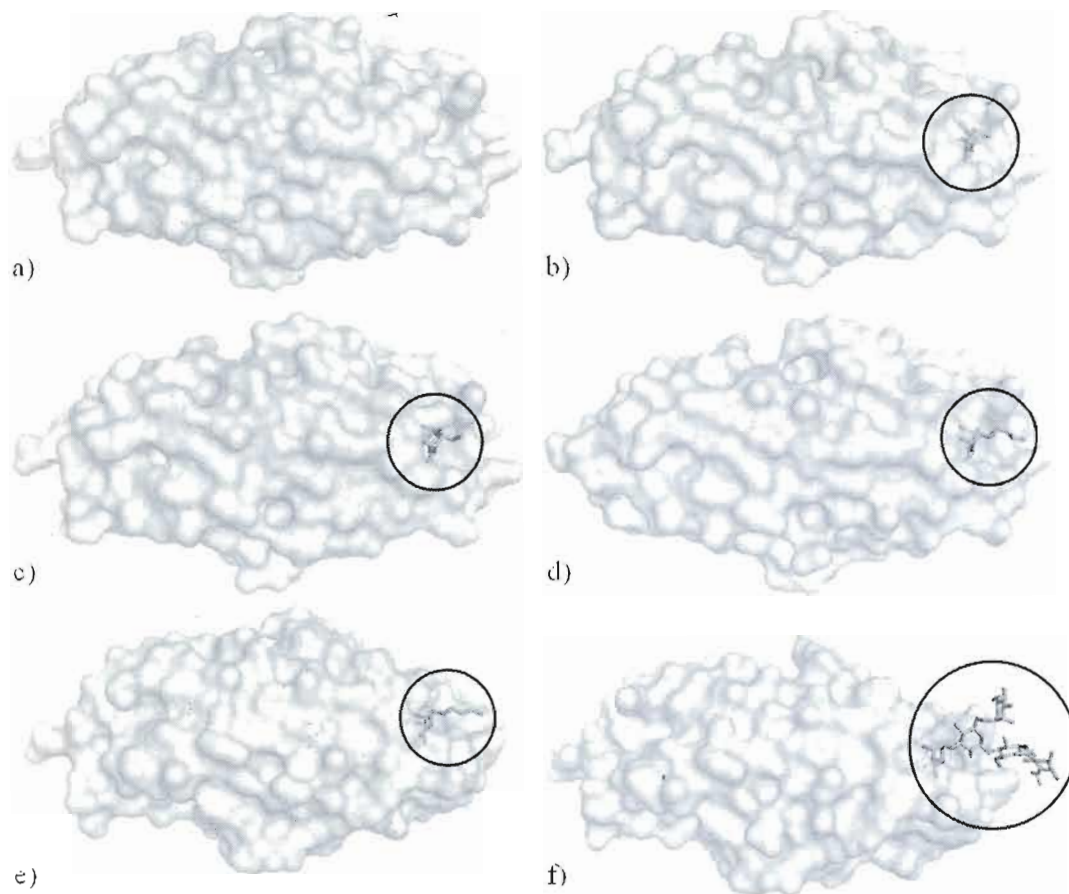


Figure 1.17 a) FimH sans ligand (Code PDB 1QUN)⁵⁴ b) complexé au D-mannose (Code PDB 1KLF)⁴⁶ c) complexé au α -D-mannopyranoside de méthyle (Code PDB 1KIU)⁴⁶ d) complexé au α -D-mannopyranoside de butyle: conformère « porte ouverte » (Code PDB 1TR7)⁵⁵ e) et conformère « porte fermée » (Code PDB 1UWF)⁵⁵ f) complexé à un pentasaccharide (Code PDB 2VCO)⁵⁶.

Afin d'empêcher l'adhésion bactérienne, l'idée est de synthétiser de nouveaux ligands, en l'occurrence des mannopyranosides, possédant une meilleure affinité pour le FimH que les glycoprotéines et glycolipides se trouvant à la surface des cellules épithéliales

⁵⁴ Choudhury, D., Thompson, A., Stojanoff, V., Langermann, S., Pinkner, J., Hultgren, S. J., and Knight, S. D., *Science*, **1999**, 285, 1061-1066

⁵⁵ Bouckaert, J., Berglund, J., Schembri, M., De Genst, E., Cools, L., Wuhler, M., Hung, C.-S., Pinkner, J., Slättegård, R., Zavialov, A., Choudhury, D., Langermann, S., Hultgren, S. J., Wyns, L., Klemm, P., Oscarson, S., Knight, S. D., and De Greve, H., *Mol. Microbiol.*, **2005**, 55, 441-455

⁵⁶ Wellens, A., Garofalo, C., Nguyen, H., Van Gerven, N., Slättegård, R., Hernalsteens, J.-P., Wyns, L., Oscarson, S., De Greve, H., Hultgren, S., and Bouckaert, J., *Plos One*, **2008**, 3, E2040

du tractus urinaire. Par le phénomène d'inhibition compétitive, les FimH des pili vont préférer se lier au ligand et par conséquent empêcher l'infection par *E. coli*. Les bactéries ainsi désactivées par un bactériostatique sont expulsées *via* le flot urinaire, ce qui ne cause aucun problème de résistance bactérienne tel qu'observé avec les antibiotiques (bactéricides).

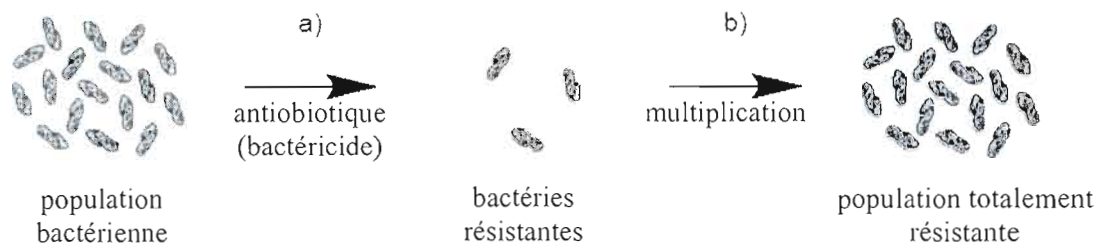


Figure 1.18 Schématisation du phénomène de résistance bactérienne.

Dans une population bactérienne normale, se trouvent des bactéries plus ou moins résistantes à l'effet des antibiotiques. En présence d'un antibiotique, les bactéries plus faibles vont mourir tandis que les bactéries plus fortes vont se multiplier, ce qui a pour effet de générer à la fin une population bactérienne totalement résistante à cet antibiotique.

Ce problème n'est que la pointe de l'iceberg, puisque de nos jours certaines bactéries deviennent résistantes à une famille complète d'antibiotiques, ce qu'on appelle le phénomène de multirésistance.

1.4 OBJECTIFS GÉNÉRAUX

Le but principal de ce présent projet est de lutter contre les infections opportunistes des souches d'*Escherichia coli* uropathogènes tout en évitant le phénomène de résistance bactérienne aux antibiotiques. Pour ce faire, nous proposons d'abord de concevoir par modélisation moléculaire puis synthétiser des composés de type α -D-mannopyrannoside qui possèdent une affinité toute particulière pour le FimH. L'étude des interactions polaires (ponts hydrogènes) et hydrophobes entre les ligands connus (D-Man, MeMan, BuMan, etc.) sera utile pour comprendre le phénomène d'association entre cette lectine et les inhibiteurs.

Du point de vue de la modélisation moléculaire, un modèle QSAR sera élaboré à partir de structures de ligands connus et testés pour leur K_d par rapport au FimH. Pour construire ce modèle mathématique, le choix de descripteurs moléculaires sera une étape importante qui aura une influence sur l'interprétation, la précision et l'exactitude des prédictions. Lorsque le modèle QSAR développé, il sera alors possible de prédire les K_d pour d'autres α -D-mannopyrannosides. Aussi, la technique d'arrimage moléculaire sera utilisée dans le but d'expliquer la différence d'activité pour deux ligands de structure également différente. De plus, il sera même possible de faire l'inverse, soit d'arrimer un mannopyrannoside potentiellement inhibiteur du FimH pour ensuite calculer son K_d .

Au niveau du laboratoire, des mannopyrannosides seront synthétisés (connus ou non) modifiés aux positions C-2 et C-6 pour tenter d'augmenter l'affinité entre la lectine et le sucre. Auparavant, avaient déjà été synthétisés des mannopyrannosides modifiés en position anomérique, deux nouvelles positions seront explorées avec des groupements soit polaires ou peu polaires. Évidemment, des stratégies de protection/déprotection devront être utilisées afin de dérivatiser ces mannopyrannosides de manière régiosélective sur les groupements alcool en question. Deux petites bibliothèques de molécules seront donc synthétisées et de nouveaux dérivés mannopyrannosides pourront avoir les positions C-2 et C-6 modifiés en même temps. Finalement, les mannopyrannosides fabriqués ainsi au laboratoire pourront faire partie d'une structure polymérique ou dendrimérique et exploiter l'effet de multivalence.

CHAPITRE II

SYNTHÈSE DE MANNOPYRANNOSIDES

2.1 INTRODUCTION

En observant, la structure d'un complexe FimH-mannopyrannoside, il est assez évident de voir que seule la position en C-1 pointe hors la protéine. Tous les autres groupements hydroxyles sont situés profondément dans le site d'interaction. D'ailleurs, le docteur Mohamed Touaibia avait déjà synthétisé au laboratoire Roy plus de 70 mannopyrannosides modifiés en position anomérique. Par rapport à la surface accessible au solvant (ou surface de Connolly), seules les positions en C-2 et C-6 sont intéressantes, car modifiables afin d'obtenir possiblement de meilleures interactions et par conséquent une valeur de K_d plus basse. Les positions C-3, C-4 et O-5 ne sont pas modifiées dans ce projet pour éviter la perte d'interactions favorables (ponts H). À la position 2, se trouve un premier volume « libre » de forme plutôt conique dont le diamètre moyen fait environ 3,2 Å par environ 4,6 Å de long à partir de OH-2 jusqu'au fond de la cavité. En fait, ce volume n'est pas totalement libre, car une molécule d'eau est conservée tout au fond. Le second espace libre se trouve à la position C-6 et est de forme plus ou moins sphérique, soit environ 4,2 Å de diamètre par à peu près 3,3 Å de profond (mesuré à partir de C-5).

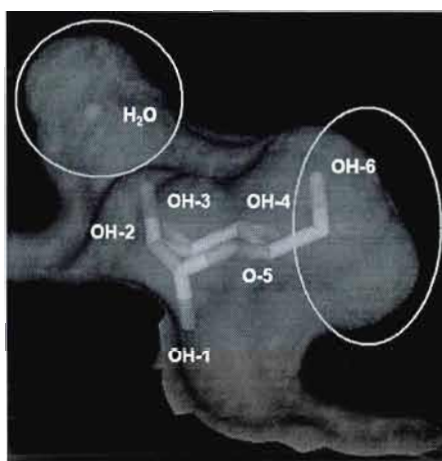


Figure 2.1 Surface accessible au solvant représentant les espaces libres en C-2 et C-6 du mannose (code PDB 1KLF)⁴⁶.

2.2 α -D-MANNOPYRANOSIDES MODIFIÉS EN C-2

Dans un premier temps, la synthèse d' α -D-mannopyrannosides de méthyle *O*-alkylés en C-2 a été effectuée. Afin de ne faire réagir que l'alcool secondaire en C-2, il a fallu utiliser une stratégie de protection/déprotection ne laissant libre seulement OH-2. Il suffit d'abord de protéger OH-4 et OH-6 à l'aide d'un benzylidène par exemple, puis de protéger OH-3 avec un groupement benzyle ou allyle. R_1 étant un méthyle, cela nous donne l'avantage de ne pas avoir à se préoccuper de la position anomérique, car OMe-1 est assez peu réactif pour ne pas interférer avec la déprotection du produit final.

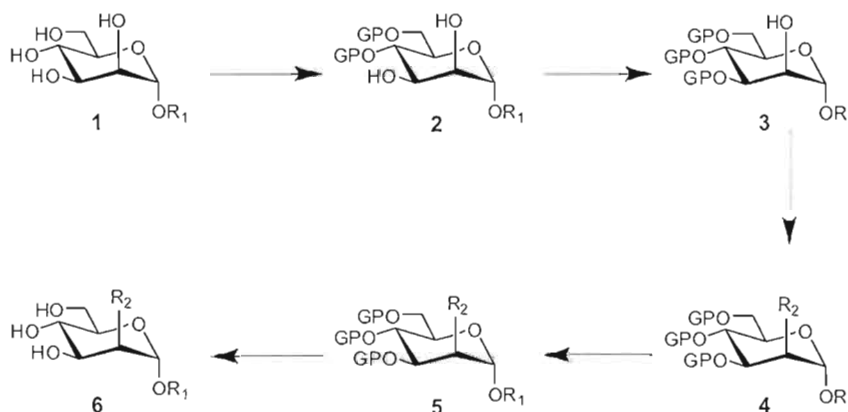


Schéma 2.1 Stratégie générale de modification de l'alcool en C-2 d'un mannopyrannoside.

Aussi, un des avantages d'utiliser un benzyle au lieu d'un allyle en position-3 est que cela simplifie grandement l'étape de déprotection. Une simple hydrogénolyse suffit à déprotéger simultanément le benzyle et le benzylidène : alors qu'une étape supplémentaire de est requise afin de se libérer du groupement allyle.⁵⁷

Toutefois, pour la synthèse d' α -D-mannopyrannosides d'allyle, il ne sera pas possible d'utiliser à la fois le 3-*O*-benzyle et le 4,6-*O*-benzylidène, puisque ces groupements protecteurs ne sont clivés en une seule étape que par l'hydrogénolyse. Cela cause un important problème: le groupement 1-*O*-allyle sera converti en groupement 1-*O*-propyle.

⁵⁷ Tomaszewski, M. J., Holme, K. R., and Perlin, A. S., *Carb. Res.*, **1991**, 217, 237-244

La modification du groupement *O*-allyle en *O*-propyle en position anomérique semble bien anodine avec une différence de deux petits atomes d'hydrogène. Cette réduction d'alcène amène une baisse d'activité biologique: le K_d du α -D-mannopyrannoside d'allyle passe de 0,085 nM à 300 nM lorsqu'il est converti en son dérivé propyle. Ce qui signifie une diminution de l'activité biologique d'un facteur d'environ 3500, ce qui est loin d'être négligeable.

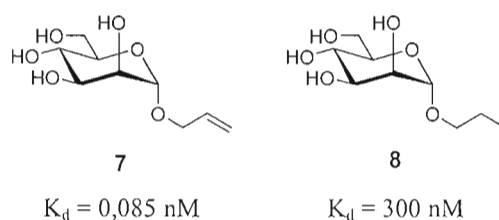


Figure 2.2 Comparaison entre l'activité biologique du α -D-mannopyrannoside d'allyle et du α -D-mannopyrannoside de propyle.

Il est difficile de savoir si les interactions hydrophobes π - π sont plus fortes que les interactions CH- π dans ce cas précis. La surface de contact étant presque la même, l'hypothèse serait que le plus haut degré de liberté du ManOPr jouerait en sa défaveur vis-à-vis le ManOAlI qui possède un lien rotatif en moins.

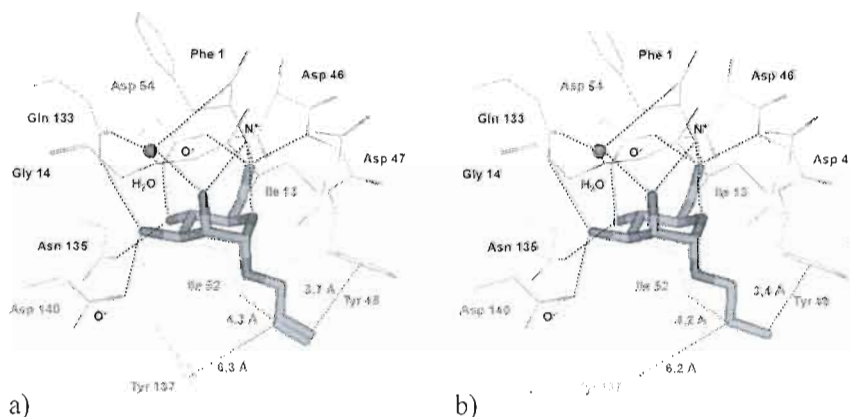


Figure 2.3 Modélisation moléculaire des interactions entre le FimH et a) ManOAlI b) ManOPr.

Afin d'éviter cette baisse d'activité biologique, a été employé un groupement 3-OBz comme substitut du groupement 3-OBn, mais toujours en protégeant OH-4 et OH-6 avec un benzylidène. La déprotection finale aura donc lieu en deux étapes: le clivage du benzylidène en milieu acide et le clivage du benzoyle dans les conditions de Zemplén.⁵⁸ Ces conditions étant plus douces que l'hydrogénolyse, l'*O*-allyle ne serait pas transformé en *O*-propyle, ce qui n'affectera pas l'activité biologique.

2.2.1 α -D-Mannopyrannosides de méthyle

D'après la stratégie générale de protection/déprotection détaillée plus haut, la première étape consiste à l'installer d'un 4,6-*O*-benzylidène sur l' α -D-mannopyrannoside de méthyle^{59,60,61}. Première réaction de ce projet, il a fallu bien du temps avant d'optimiser les conditions pour obtenir un rendement convenable de plus de 40%. En fait, il s'agissait d'employer qu'un seul équivalent de $\text{PhCH}(\text{OMe})_2$ (sans grand excès) au lieu d'utiliser le benzaldéhyde. L'ajout doit se faire lentement (gouttes à gouttes) avec une agitation maximale sous des conditions de température avoisinant le 0°C. Un réchauffement lent jusqu'à la température de la pièce permet d'obtenir le benzylidène **4** avec des rendements presque quantitatifs.

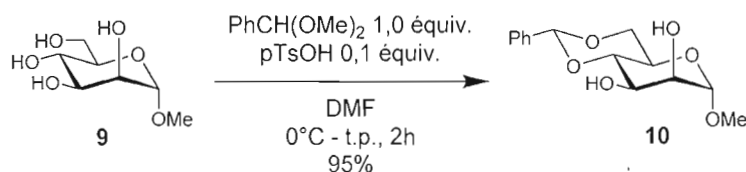


Schéma 2.2 Conditions de 4,6-*O*-benzylidénation sélective du mannopyrannoside **9**.

Mais pourquoi de ne pas utiliser le benzaldéhyde comme solvant, avec un ajout normal ou d'un coup (peu importe), avec une agitation normale et le tout à température pièce? Pourtant cela fonctionne presque quantitativement avec des α -D-glucopyrannosides ou

⁵⁸ Indurugalla, D., Watson, J. N., and Bennet, A. J., *Org. Biomol. Chem.*, **2006**, 4, 4453-4459

⁵⁹ Buchanan, J. G., and Schwarz, J. C. P., *J. Chem. Soc.*, **1962**, 86, 4770-4777

⁶⁰ Albert, R., Dax, K., Pleschko, R., and Stutz, A. E., *Carb. Res.*, **1985**, 137, 282-290

⁶¹ Tanaka, N., Ogawa, I., Yoshigase, S., and Nokami, J., *Carb. Res.*, **2008**, 343, 2675-2679

encore des α -D-glucopyrannosides. Cela s'explique en fait par la structure même d'un mannopyrannoside. Les alcools en C-2 et C-3 se trouvent en configuration *cis* chez un mannopyrannoside, alors que ces mêmes groupes se trouvent en *trans* pour un glucopyrannoside ou un galactopyrannoside. Les acétals cycliques basés sur le carbone (isopropylidènes, benzylidènes...) ne peuvent protéger deux groupements alcool d'un sucre se trouvant dans la configuration *trans*. C'est pourquoi il est possible de synthétiser des 2,3-O-benzylidène- α -D-mannopyrannosides et non pas des 2,3-O-benzylidène- α -D-glucopyrannosides ni des 2,3-O-benzylidène- α -D-galactopyrannosides. Mais encore, cela explique pourquoi il ne faut pas utiliser un large excès de $\text{PhCH}(\text{OMe})_2$, car il y aurait forcément formation de 2,3:4,6-di-O-benzylidène- α -D-mannopyrannosides.

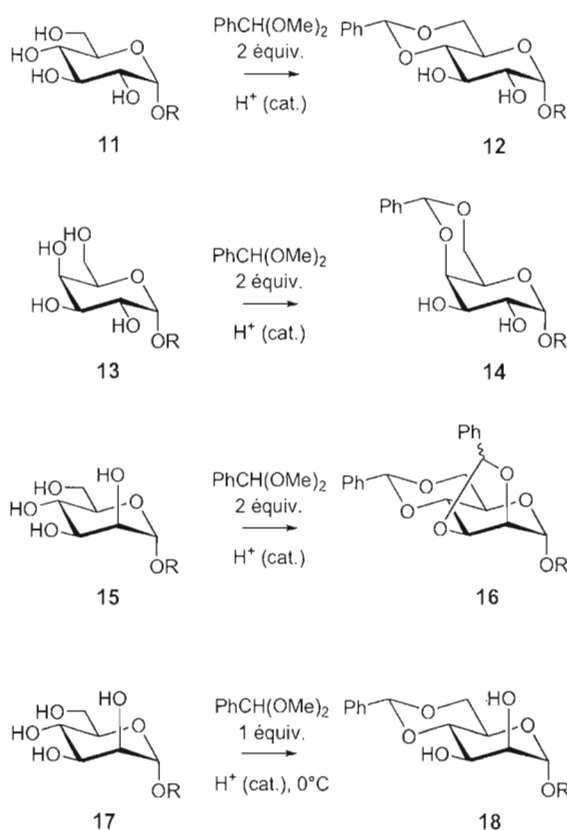


Schéma 2.3 Formation de benzylidène sur un glucopyrannoside, un galactopyrannoside et un mannopyrannoside.

Aussi, c'est pourquoi le contrôle de la température est l'élément le plus important pour effectuer cette benzylidénation sélective. En fait, à basse température (tel que 0°C) un premier équivalent de PhCH(OMe)_2 va nécessairement réagir d'abord avec l'alcool primaire en C-6 (plus réactif que les alcools secondaires) pour former le 4,6-*O*-benzylidène- α -D-mannopyrannoside et le second équivalent va finir par donner le 2,3:4,6-di-*O*-benzylidène- α -D-mannopyrannoside si assez de temps est laissé à la réaction. Inversement, à plus haute température (à 25°C par exemple), l'agitation thermique étant plus importante, la chimiosélectivité est diminuée en défaveur du 4,6-*O*-benzylidène- α -D-mannopyrannoside, ce qui donne en fait un mélange de 4,6-*O*-benzylidène- α -D-mannopyrannoside, d'*exo*-2,3:4,6-di-*O*-benzylidène- α -D-mannopyrannoside, d'*endo*-2,3:4,6-di-*O*-benzylidène- α -D-mannopyrannoside et d' α -D-mannopyrannoside de départ, d'autant plus si l'ajout n'est pas fait gouttes à gouttes et/ou avec une faible agitation mécanique.

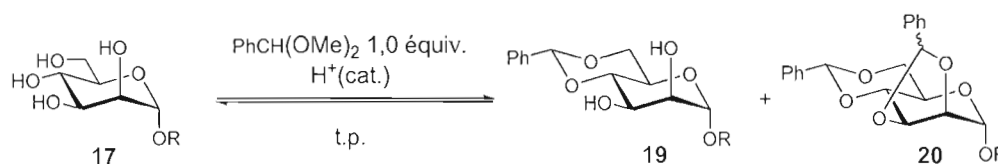


Schéma 2.4 Benzylidénation du MeMan sans contrôle de température.

Les rendements sont en général très faibles, sauf lorsque la température est contrôlée vers le bas (0°C). En utilisant les mêmes conditions que le papier initial⁵⁹, sont obtenus des rendements très similaires, mais peu satisfaisants. L'acide utilisé et le type de solvant n'affectent pas tellement l'efficacité de la réaction. Bien entendu, le contrôle des équivalents permet une sélectivité entre le mono- et le dibenzylidène.

Agent d'acétalisation	Acide	Solvant	Température	Rendement
PhCHO, 25 équiv.	HCOOH 88%, 10 équiv.	PhCHO:HCOOH	t.p.	18%
PhCHO, 25 équiv.	HCOOH 99+%, 10 équiv.	PhCHO:HCOOH	t.p.	37%
PhCHO, 25 équiv.	AcOH glacial, 10 équiv.	PhCHO:AcOH	t.p.	traces

PhCHO, 1 équiv.	HCOOH 99+%, 10 équiv.	HCOOH 99+%	t.p.	13%
PhCH (OMe) ₂ , 1 équiv.	HCOOH 99+%, 10 équiv.	HCOOH 99+%	t.p.	19%
PhCH (OMe) ₂ , 1 équiv.	<i>p</i> TsOH, 1 équiv.	DMF	t.p.	traces
PhCH (OMe) ₂ , 1 équiv.	<i>p</i> TsOH, 1 équiv.	DMF	100°C	10%
PhCH (OMe) ₂ , 1 équiv.	HBF ₄ , 1 équiv.	DMF	t.p.	16%
PhCH (OMe) ₂ , 1 équiv.	CSA, 1 équiv.	DMF	t.p.	38%
PhCH (OMe) ₂ , 1 équiv.	<i>p</i> TsOH, 1 équiv.	DMF	0°C → t.p.	95%

Tableau 2.1 Optimisation des conditions de 4,6-*O*-benzylidénation sélective du MeMan.

Comme solution alternative, il aurait été aussi possible d'effectuer une débenzylidénation sélective à partir du 2,3:4,6-di-*O*-benzylidène- α -D-mannopyrannoside de méthyle pour obtenir le 4,6-*O*-benzylidène- α -D-mannopyrannoside de méthyle désiré. Dans la littérature, quelques méthodes sont utilisées à cette fin, soit l'emploi de l'acide phosphomolybdique⁶² ou par transfert catalytique d'hydrogène^{63,64}. Ce genre de réaction prend avantage sur le fait que les dioxolanes (cycles à 5 membres) sont plus fragiles que les dioxanes (cycles à 6 membres), ce qui explique leur réactivité différente.



Schéma 2.5 2,3-*O*-débenzylidénation sélective du mannopyrannoside **21**.

La formation d'acétals en milieu acide est en fait une suite de réactions à l'équilibre et par conséquent très sensible aux conditions réactionnelles. En fait, tant que le milieu reste acide, le benzylidène est susceptible de se faire attaquer par des nucléophiles. C'est pourquoi il faut s'assurer d'être en conditions anhydres et utiliser des réactifs (solvant, acide, agent d'acétalisation) bien secs. C'est pourquoi avec l'acide formique 88%, qui contient 12% d'eau, il est difficile d'obtenir des rendements convenables. Aussi, c'est la raison pour laquelle le PhCH(OMe)₂ a été finalement choisi à la place du PhCHO. Dans le cas du

⁶² Kumar, P. S., Kumar, G. D. K., and Baskaran, S., *Eur. J. Org. Chem.*, **2008**, 6063-6067

⁶³ Bieg, T., and Szeja, W., *Communications*, **1986**, 317-318

⁶⁴ Bieg, T., and Szeja, W., *Carb. Res.*, **1985**, 140, C7-C8

$\text{PhCH}(\text{OMe})_2$, deux molécules de méthanol sont libérées dans le milieu réactionnel, alors que c'est une molécule avec le PhCHO . Évidemment, c'est une quantité assez minime, mais suffisante pour déplacer l'équilibre vers la gauche. De plus, même si l'eau est produite en plus petite quantité que le méthanol, ce dernier étant plus volatil il peut être éliminé plus rapidement du ballon réactionnel lors du parachèvement de la réaction sur évaporateur rotatif. L'élimination de l'eau peut se faire également à l'aide d'un Dean-Stark.

Le mécanisme de benzyldénation commence d'abord par l'activation de l'agent d'acétalation, c'est-à-dire par sa protonation dans le milieu acide. Ici, le diméthylacétal du benzaldéhyde perd une molécule de méthanol pour former un ion oxonium réactif. Ce dernier va donc subir une attaque nucléophile de la part de l'alcool primaire, plus réactif que les alcools secondaires, pour former l'hémiacétal. Après protonation, l'hémiacétal nouvellement formé subit une attaque nucléophile de la part de l'alcool en C-4, le seul voisin de l'alcool en C-6, pour former finalement un acétal cyclique, le 4,6-*O*-benzyldène. Cette réaction de protection est en fait une transacétalation: l'acétal de départ est transféré à l'acétal final.

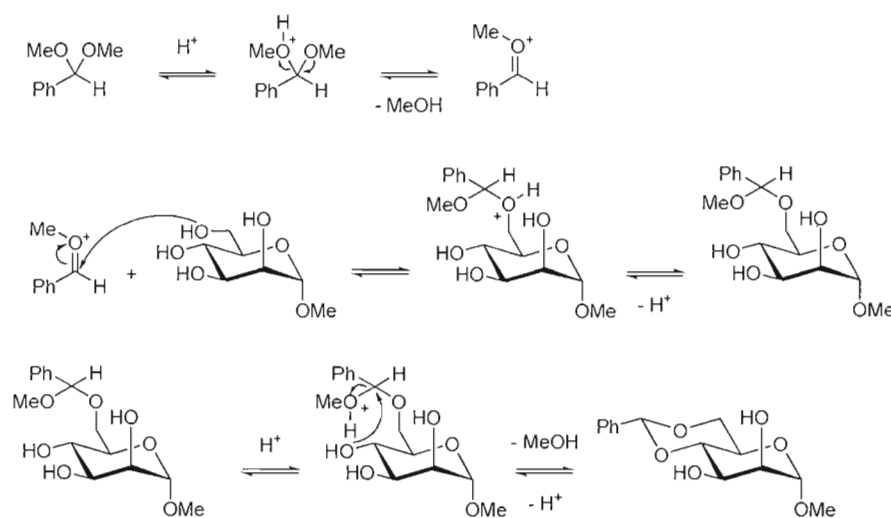


Schéma 2.6 Mécanisme de 4,6-*O*-benzyldénation sélective du MeMan.

Afin de modifier sélectivement l'alcool en position C-2, il faut protéger l'alcool en position C-3. Pour s'y faire, un acétal d'étain a d'abord été formé en présence d'oxyde de

dibutylétain^{57,65}. Le mécanisme réactionnel est pratiquement le même que l'acétalisation, une molécule d'eau est libérée dans le milieu réactionnel. Cette fois-ci, le Dean-Stark a été employé pour éliminer l'eau qui forme un azéotrope avec le solvant (benzène ou toluène).

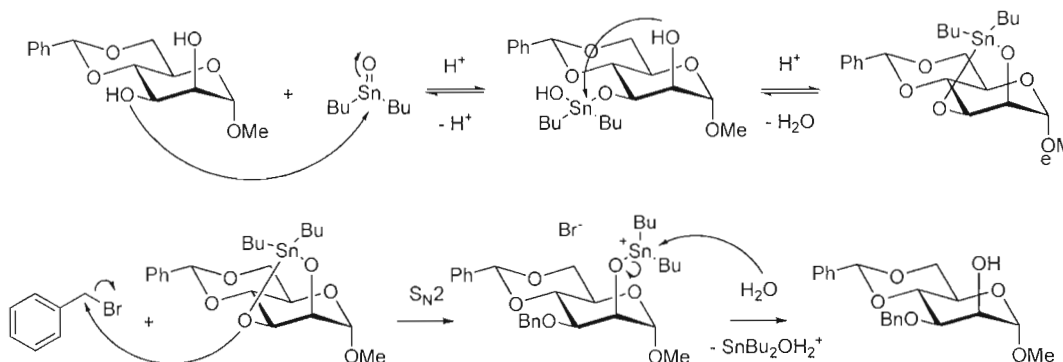


Schéma 2.7 Mécanisme de 3-O-benzoylation sélective du mannopyrannoside **10**.

L'acétal d'étain obtenu, comme d'autres acétals d'étain de sucre⁶⁶, est un produit isolable et que l'on doit conserver à l'abri de l'humidité. Ce qui n'a pas été fait, puisqu'une seconde réaction a été lancée immédiatement dans une séquence *one pot* de deux étapes en tout.

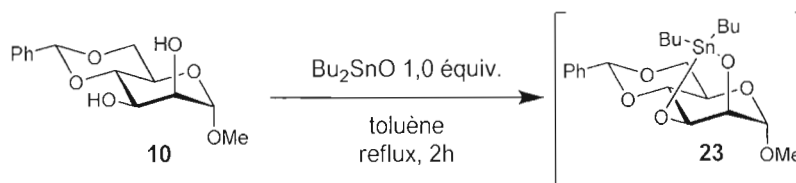


Schéma 2.8 Conditions de stannylidénation du mannopyrannoside **10**.

Cette seconde étape consiste en la benzoylation sélective de l'alcool en C-3 avec un excès de bromure de benzyle^{57,65}. Le mécanisme de la benzoylation est en fait une S_N2 classique qui forme un complexe d'étain en C-2. Ce dernier est détruit lors du traitement aqueux de la réaction.

⁶⁵ Nashed, M., and Anderson, L., *Tetrahedron Lett.*, **1976**, 39, 3503-3506

⁶⁶ Kricheldorf, H. R., and Stricker A., *Macromolecules.*, **2000**, 33, 696-701

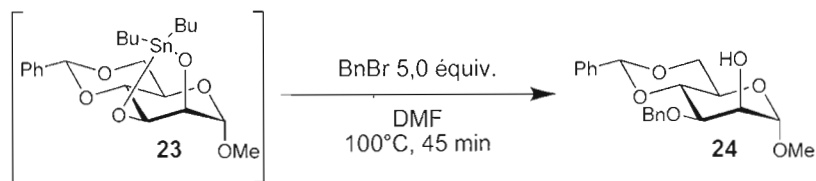


Schéma 2.9 Conditions de 3-*O*-benzylation sélective du mannopyrannoside **23**.

Tel qu'énoncé plus haut, les premières modifications en C-2 ont été des alkylations de courtes chaînes carbonées: 2-*O*-méthyle, 2-*O*-éthyle, 2-*O*-propyle et 2-*O*-isopropyle.⁵⁷ Cela a pour but de remplir au maximum le volume dans cette région et de potentiellement faire des interactions hydrophobes avec les résidus Phe1, Ile13, Phe142 et Phe144 du FimH.

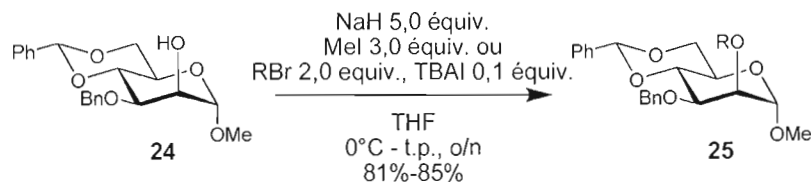


Schéma 2.10 Conditions générales de 2-*O*-alkylation du mannopyrannoside **24**.

Voici le mécanisme réactionnel général:

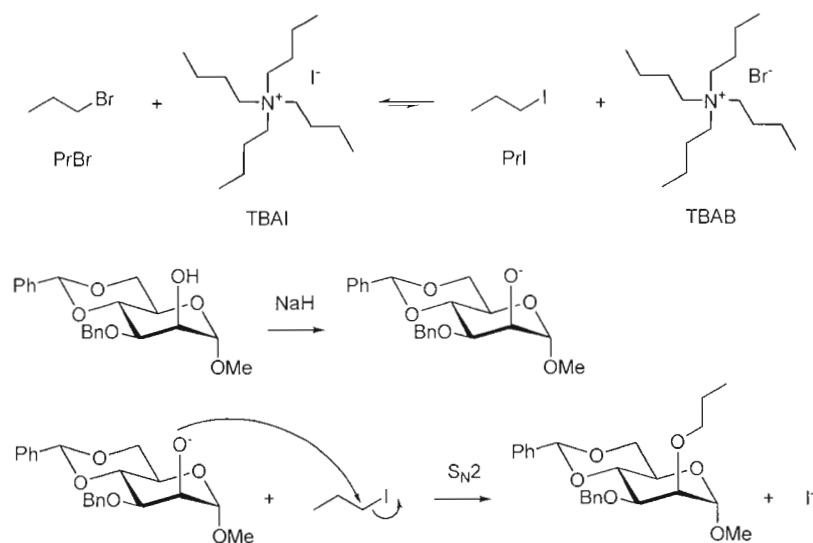


Schéma 2.11 Mécanisme de 2-*O*-propylation du mannopyrannoside **24**.

Pour ce faire, le NaH a été utilisé comme base (pKa de 35) afin de déprotoner l'alcool en C-2 (pKa de 16,5). L'alcoolate ainsi formé vient attaquer l'iodure d'alkyle du milieu réactionnel *via* un mécanisme S_N2 pour former le 2-*O*-alkyle désiré. L'utilité du TBAI est de convertir *in situ* les bromures d'alkyle en iodures correspondants qui sont plus réactifs.

Molécule	Agent alkylant	Réactifs	Conditions	Rendement
26	MeI 3,0 équiv.	NaH 5,0 équiv. pas de TBAI	THF 0°C - t.p. o/n	85%
27	EtBr 2,0 équiv.	NaH 5,0 équiv. TBAI 0,1 équiv.	THF 0°C - t.p. o/n	82%
28	PrBr 2,0 équiv.	NaH 5,0 équiv. TBAI 0,1 équiv.	THF 0°C - t.p. o/n	81%
29	<i>i</i> -PrBr 2,0 équiv.	NaH 5,0 équiv. TBAI 0,1 équiv.	THF 0°C - t.p. o/n	7%

Tableau 2.2 Conditions de 2-*O*-alkylation des mannopyrannosides **26**, **27**, **28** et **29**.

Dans le cas de la 2-*O*-isopropylation, le rendement est nettement plus bas à cause de la nature du réactif: le 2-iodopropyle est secondaire. L'encombrement stérique d'un substrat secondaire ralentit considérablement la vitesse de réaction (soit un facteur d'environ 50)⁶⁷. Alors, il aurait fallu laisser un temps de réaction plus long, voire même rajouter régulièrement des nouveaux apports de 2-iodopropyle.

Une voie alternative aurait été d'acétyler l'alcool en C-2 pour ensuite faire une réaction de Petasis ou de Tebbe.⁶⁸ Lors de l'hydrogénolyse finale, qui déprotège à la fois le

⁶⁷ Solomons, G., et Fryhle, C., Chimie organique, Modulo, 7^e édition, **2000**, pp. 225-226

⁶⁸ Le Diguarher, T., Billington, D. C., et Dorey, G., *Syn. Comm.*, **1995**, 25, 1633-1639

4,6-*O*-benzylidène et le 3-*O*-benzyle, le 2-propène est réduit en isopropyle par la même occasion. Par contre, cela allonge la synthèse de deux étapes.

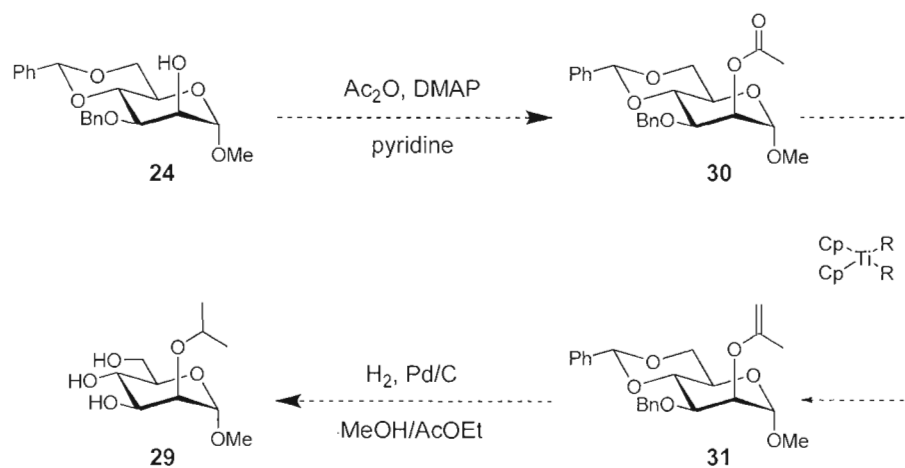


Schéma 2.12 Voie alternative à la 2-*O*-isopropylation.

Suite aux réactions d'alkylation, il ne reste plus qu'à effectuer une hydrogénolyse⁵⁷ pour libérer les alcools de leur groupe protecteur.

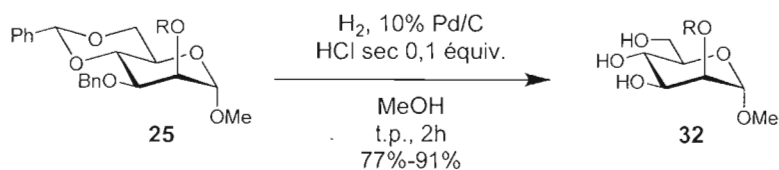


Schéma 2.13 Conditions générales d'hydrogénolyse.

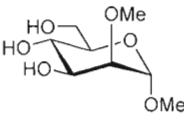
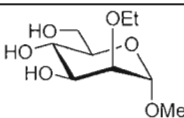
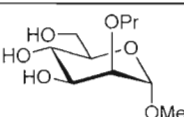
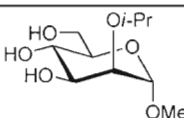
Produit	Conditions	Rendement
 33	H_2 , Pd/C 10% m/m HCl sec 0,1 équiv. MeOH, t.p., 2h	91%
 34	H_2 , Pd/C 10% m/m HCl sec 0,1 équiv. MeOH, t.p., 2h	85%
 35	H_2 , Pd/C 10% m/m HCl sec 0,1 équiv. MeOH, t.p., 2h	77%
 36	H_2 , Pd/C 10% m/m HCl sec 0,1 équiv. MeOH, t.p., 2h	38%

Tableau 2.3 Conditions d'hydrogénolyse des mannopyrannosides **33**, **34**, **35** et **36**.

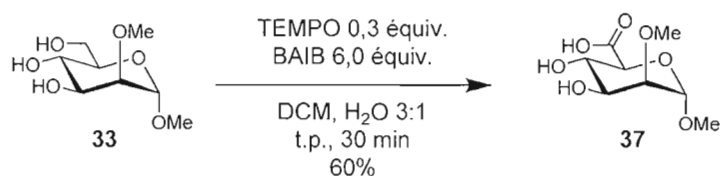


Schéma 2.14 Conditions d'oxydation sélective du mannopyrannoside **33**.

Par la suite, une série d'acides 2-*O*-alkyl- α -D-mannopyrannosiduroniques de méthyle a été commencée. L'acide α -D-mannopyrannosiduroniques de méthyle ayant déjà été synthétisé au laboratoire Roy, l'acide 2-*O*-méthyl- α -D-mannopyrannosiduronique de méthyle a suivi à partir du 2-*O*-méthyl- α -D-mannopyrannosides de méthyle tout juste préparé. Il s'agit simplement de faire une oxydation sélective sur l'alcool primaire pour le convertir en acide carboxylique tout en évitant la conversion des alcools secondaires en cétones. Pour s'y faire,

une quantité catalytique de TEMPO a été utilisée en présence d'un excès de BAIB comme co-oxydant et d'eau⁶⁹.

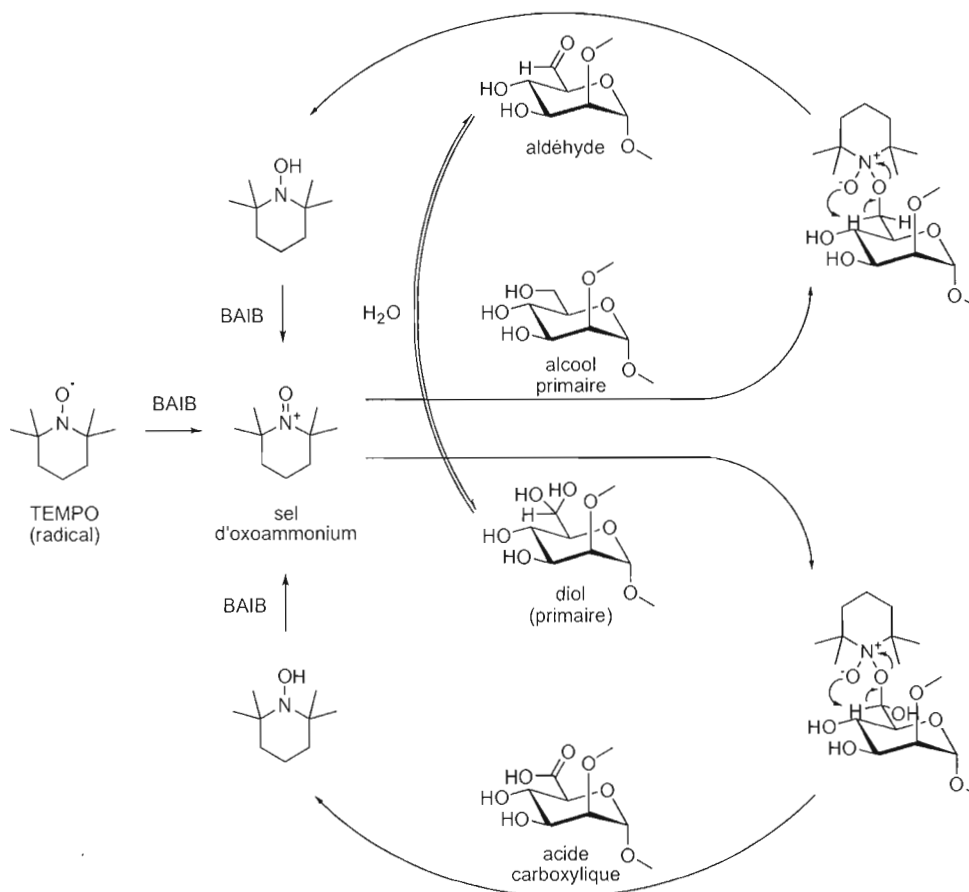


Schéma 2.15 Mécanisme d'oxydation d'un alcool primaire en acide carboxylique avec TEMPO en présence de BAIB.

Le TEMPO est un radical stabilisé par les quatre groupements méthyle voisins⁷⁰ qui est utilisé notamment comme piège à radicaux ou comme oxydant en synthèse organique. Le mécanisme réactionnel débute par l'oxydation du radical TEMPO en sel d'oxoammonium. Ce dernier subit une attaque nucléophile de la part de l'alcool primaire pour former un aldéhyde et une hydroxylamine. Cette hydroxylamine est recyclée *via* l'oxydation par le

⁶⁹ Epp, J. B., and Widlanski, T. S., *JOC*, **1999**, 64, 293-295

⁷⁰ Zanocco, A. L., Canetem., A. Y., and Melendez, M. X., *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*, **2000**, 45, 123-129

BAIB pour reformer le sel d'oxoammonium. L'aldéhyde nouvellement formé se convertit, par la présence d'eau, en hydrate qui fait subir une attaque nucléophile au sel d'oxoammonium. L'hydroxylamine résultante est toujours recyclée en sel d'oxoammonium *via* l'oxydation par le BAIB. Cela donne donc finalement l'acide carboxylique désiré en position C-6. Dans ces conditions, l'agitation doit être particulièrement vigoureuse (maximale) afin de favoriser une émulsion constante entre l'eau et le dichlorométhane. La solubilité du substrat à oxyder ainsi que le ratio H₂O:DCM doivent certainement avoir une influence sur le rendement final.

Étant donné que l'acide α -D-mannopyrannosiduroniques de méthyle n'a pas d'activité biologique, aucun autre composé de la série des 2-O-alkyl- α -D-mannopyrannosiduroniques de méthyle n'a été synthétisé.

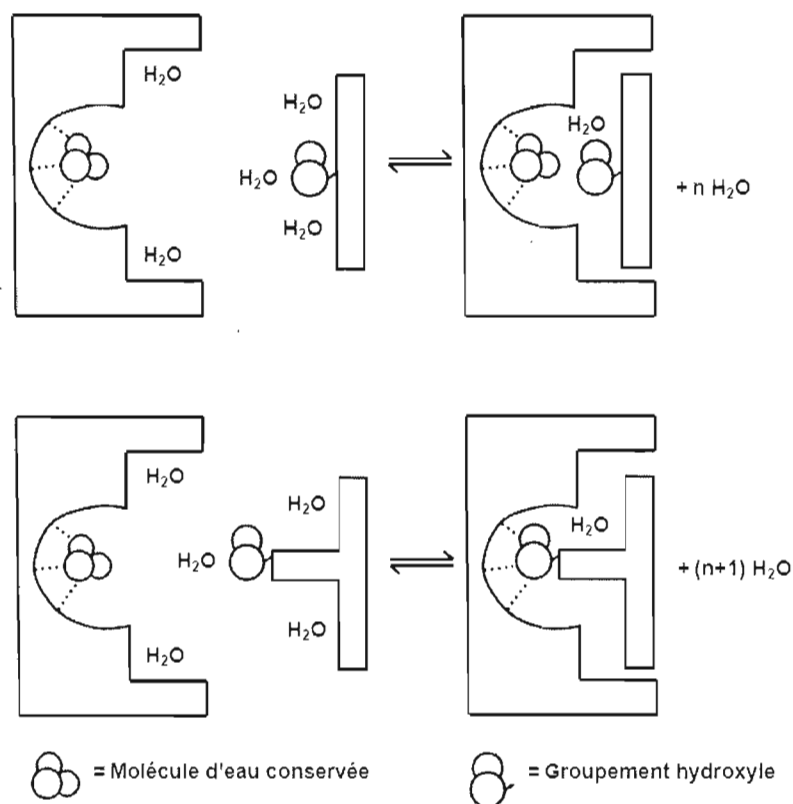


Figure 2.4 Principe de substitution d'une molécule d'eau conservée par un groupement hydroxyle (tiré directement de l'article de Boons).⁷¹

Dans une autre optique, a été synthétisé le 2-*O*-hydroxyéthyl- α -D-mannopyrannoside de méthyle ⁷¹. Cette molécule étant allongée de deux méthylènes par rapport au MeMan, le groupement hydroxyle peut prendre la place d'une molécule d'eau conservée du site d'interaction. Ainsi expulsée, cette dernière rejoint les autres molécules d'eau du milieu (solvatation), et ce, avec un gain d'entropie (ΔS).

En supposant qu'il y ait maintien de l'enthalpie (ΔH), il y aura donc perte d'énergie libre (ΔG) et l'association de la protéine avec le ligand sera d'autant plus favorisée. Puisque la constante d'association (K_a), l'inverse de la constante de dissociation (K_d), est directement reliée à l'énergie libre du système, cela signifie des valeurs plus petites de K_d .

$$\begin{aligned}\Delta G &= \Delta H - T\Delta S \\ \Delta G &= -RT \ln K_a \\ K_d &= 1 / K_a \\ \Delta G &= \Delta H - T\Delta S = -RT \ln (1/K_d)\end{aligned}$$

Tableau 2.4 Formules reliant les paramètres thermodynamiques à la constante de dissociation (K_d).

Tout d'abord, il s'agit de former le dérivé 2-*O*-allyle à partir du 3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidène- α -D-mannopyrannoside de méthyle dans les mêmes conditions d'alkylation que précédemment.

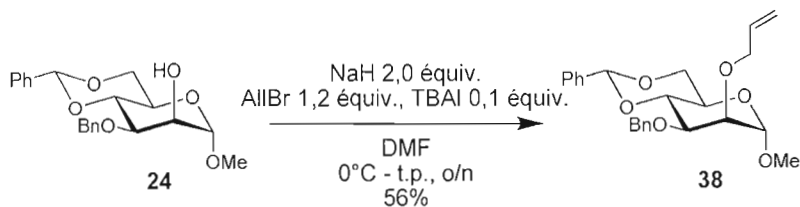


Schéma 2.16 Conditions d'allylation du mannopyrannoside **24**.

En second lieu, l'oxydation du dérivé 2-*O*-allyle *via* l'ozonolyse mène à l'aldéhyde qui n'est pas isolable.

⁷¹ Clarke, C., Woods, R. J., Gluska, J., Cooper, A., Nutley, M. A., et Boons, G.-J., *JACS*, **2001**, 123, 12238-12247

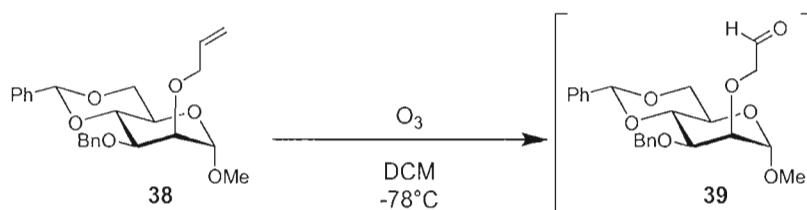


Schéma 2.17 Conditions d'ozonolyse du mannopyrannoside **38**.

Le parachèvement de la réaction *via* une réduction au NaBH_4 mène au composé 2-hydroxyéthyle protégé.⁷²

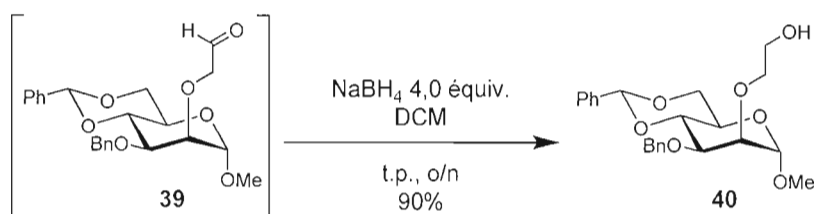


Schéma 2.18 Parachèvement en milieu réducteur du mannopyrannoside **39**.

La déprotection a lieu dans les conditions standard d'hydrogénolyse.

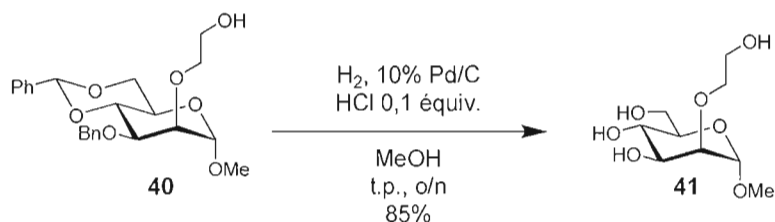


Schéma 2.19 Conditions d'hydrogénolyse du mannopyrannoside **40**.

Pour ce qui est du mécanisme réactionnel, il y a d'abord une cycloaddition 1,3-dipolaire de l'ozone sur l'alcène pour former un molozone. Ensuite, il y a rétrocycloaddition 1,3-dipolaire pour former un oxyde de carbonyle (l'intermédiaire de Criegee) et un aldéhyde. Ce dernier n'est pas isolable puisqu'il réagit immédiatement avec l'oxyde de carbonyle *via* une seconde cycloaddition 1,3-dipolaire pour former un ozonide (un

⁷² Lowary, T. L., Eichler, E., and Bundle D. R., *Can. J. Chem.*, **2002**, 80, 1112-1130

trioxolane). Tel qu'énoncé plus haut, le parachèvement de la réaction *via* une réduction au NaBH_4 mène à l'éthylhydroxyle en position C-2.

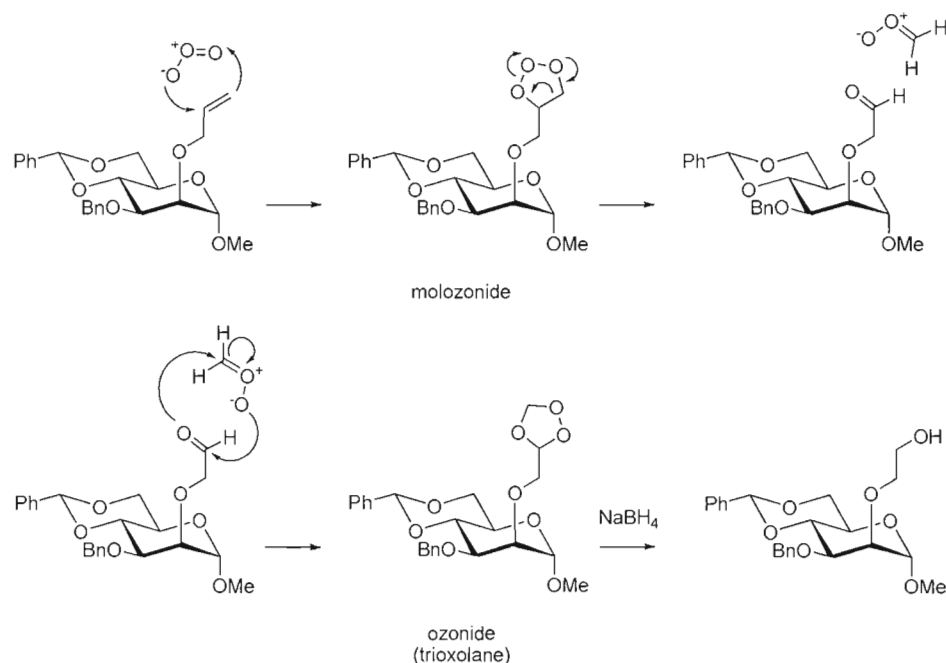


Schéma 2.20 Mécanisme d'ozonolyse d'un groupement *O*-allyle.⁷³

2.2.2 α -D-Mannopyrannosides d'allyle

Pour des raisons décrites plus loin, a été synthétisée une série de composé du type α -D-mannopyrannoside d'allyle. Seul le 2-désoxy-2-fluoro- α -D-mannopyrannoside d'allyle a été synthétisé comme modification en C-2, tous les autres dérivés ont été modifiés en C-6. L'étape désoxyfluoration épimérise un carbone, alors la configuration absolue de ce carbone doit être l'inverse dès le départ. Aussi, le groupement *O*-allyle en C-1 est réduit lors d'une hydrogénolyse. C'est pourquoi la stratégie générale de protection/déprotection des α -D-mannopyrannosides de méthyle a été modifiée.

⁷³ Criegee, R., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1975**, *87*, 745-752

Il suffit d'abord de protéger OH-4 et OH-6 du GlcOAll, à l'aide d'un benzylidène par exemple, puis de protéger OH-3 avec un groupement benzoyle (au lieu du benzyle de la stratégie générale initiale). R_1 étant un allyle, il faut éviter l'hydrogénolyse pour ne pas le convertir en propyle (les raisons sont énoncées plus bas). L'étape de désoxyfluoration épimérise le carbone C-2 pour donner un α -D-mannopyrannoside d'allyle protégé. Deux étapes de déprotection sont ensuite nécessaires pour obtenir le produit final désiré.

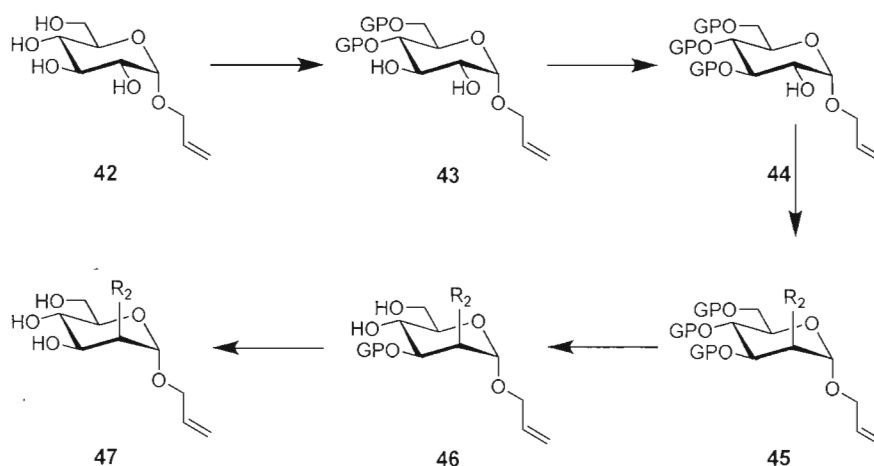


Schéma 2.21 Stratégie générale de désoxyfluoration de l'alcool en C-2.

La première étape consiste en l'allylation en C-1 par la réaction de Fischer avec l'alcool allylique en milieu acide. Cette réaction mène à un mélange de produits: soit des α -/ β -D-glucopyrannosides et des α -/ β -D-glucofurannosides. Le produit nettement majoritaire est l' α -D-glucopyrannoside d'allyle à cause de l'effet anomérique expliqué plus loin. Le mécanisme réactionnel est également décrit plus bas.

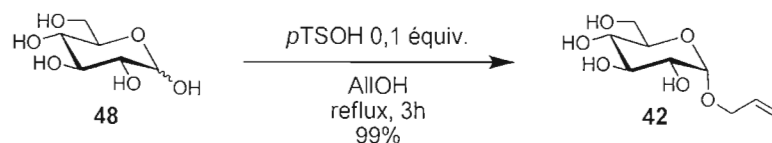


Schéma 2.22 Conditions de glycosidation de Fischer du glucopyranoside 48.

Par la suite, une 4,6-*O*-benzylidénation est effectuée dans les conditions générales pour un glucopyrannoside telles que mentionnées plus haut.

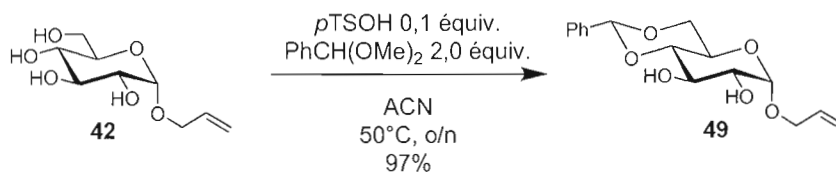


Schéma 2.23 Conditions de 4,6-*O*-benzylidénation du glycoside **42**.

Afin de ne laisser libre que l'alcool en C-2, une benzylation sélective⁷⁴ en C-3 est effectuée. Le choix du groupement protecteur de type acyle (benzoyle) est préféré au type alkyle (benzyle) pour éviter de réduire l'allyle en propyle.

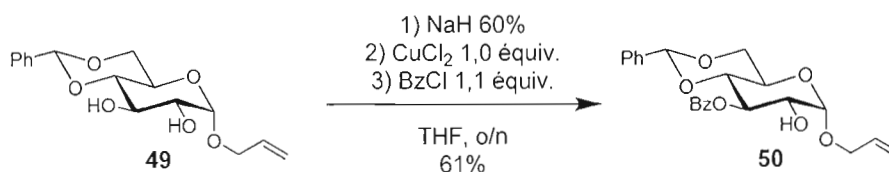


Schéma 2.24 Conditions de 3-*O*-benzylation sélective du glucopyrannoside **49**.

Chez les monosaccharides (D-glucose, D-galactose ou D-mannose), se trouvent cinq groupements alcools qui peuvent tous être acylés (acétylés, benzoylés, mésylés, tosylés...). Par contre, les différents groupes alcools ne vont pas réagir à la même vitesse face à l'acylation. En général, la réactivité des groupements hydroxyles se fait dans cet ordre: méthyle > primaires > secondaires > tertiaires. Quant aux trois sucres mentionnés ci-haut, il n'y a qu'un alcool primaire (en C-6) et quatre alcools secondaires soit de configuration axiale ou équatoriale. D'une manière encore générale, les alcools équatoriaux sont plus réactifs que les alcools axiaux.⁷⁵

⁷⁴ Osborn, H. M. I., Brome, V. A., Harwood, L. M., and Suthers, W. G., *Carb. Res.*, **2001**, 332, 157-166

⁷⁵ Haines, A. H., *Adv. Carb. Chem. Biochem.*, **1976**, 33, 11-109

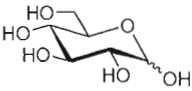
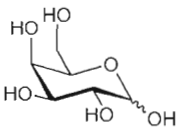
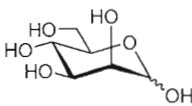
Produit	Réactivité relative des groupements OH
 D-glucose	OH-1 > OH-6 > OH-2 _(éq.) > OH-3 _(éq.) > OH-4 _(éq.)
 D-galactose	OH-1 > OH-6 > OH-2 _(éq.) > OH-3 _(éq.) > OH-4 _(ax.)
 D-mannose	OH-1 > OH-6 > OH-3 _(éq.) > OH-2 _(ax.) > OH-4 _(éq.)

Tableau 2.5 Réactivité relative des alcools du D-glucose, D-galactose et D-mannose.

Étant donné l'effet anomérique, la densité électronique de l'alcool en C-1 se trouve enrichie, sa vitesse de réaction face à l'acylation est très rapide, même plus rapide que l'alcool primaire en C-6. Ce dernier se trouve donc à être le second groupe hydroxyle à réagir, suivis des alcools secondaires. La configuration axiale ou équatoriale détermine la réactivité des alcools en C-2 et C-3, ce qui a pour effet de donner une réactivité différente au D-glucose, au D-galactose et au D-mannose (ou aux glycosides correspondants). Quant à l'alcool en C-4, il est invariablement trop gêné stériquement par ses voisins, OH-3 et OH-6, pour réagir aussi rapidement que les autres alcools secondaires.⁷⁶

Par la suite, l'alcool en C-2 est désoxyfluoré à l'aide du DAST. Cela mène donc à l'épimérisation du carbone C-2 pour donner un 2-fluoro mannopyranoside protégé. Le mécanisme réactionnel avec le DAST est expliqué plus loin.

⁷⁶ Miljković, M., *Carbohydrates*. 2010. Chapitre 5, 113-142

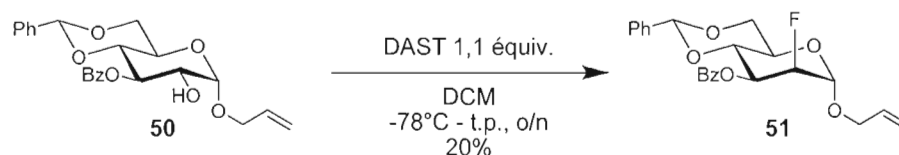


Schéma 2.25 Conditions de desoxyfluoruration du glucopyranoside **50**.

Pour terminer, la déprotection se fait deux étapes: la déprotection du 4,6-*O*-benzylidène en milieu acide suivie d'une désacétylation dans les conditions de Zemplén. Ce dernier mécanisme réactionnel est également explicité que plus loin.

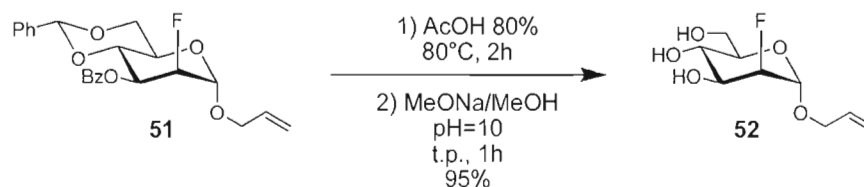


Schéma 2.26 Conditions de déprotection du mannopyranoside **51**.

Pour ce qui est du mécanisme réactionnel de la 4,6-*O*-débenzylidénation, il s'agit en gros des mêmes étapes de la 4,6-*O*-benzylidénation, mais dans le sens inverse. Il y a d'abord protonation d'un oxygène de l'acétal puis attaque d'une molécule d'eau. Après déprotonation, il y a formation de l'hémiacétal et déprotection d'un groupement alcool. Les mêmes étapes s'appliquent à l'hémiacétal pour former le diol déprotégé et libération du benzaldéhyde. En fait, c'est l'alcool en C-6 qui est d'abord libéré, puis vient le tour de celui en C-4, car l'ion oxocarbénium primaire est plus stable que le secondaire. La déprotection d'un benzylidène est en fait une transacétalation.

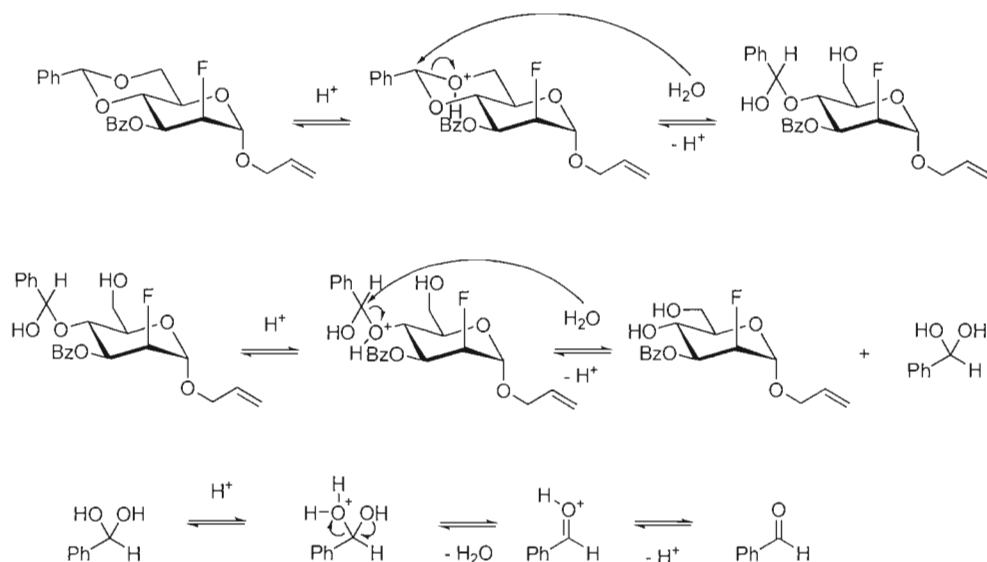


Schéma 2.27 Mécanisme de 4,6-*O*-débenzyldénation du mannopyrannoside **51**.

2.3 α -D-MANNOPYRANNOSIDES MODIFIÉS EN C-6

Dans un deuxième temps, la synthèse d' α -D-mannopyrannosides modifiés en C-6 a été effectuée. Afin que de ne faire réagir que l'alcool secondaire en C-6, il a fallu utiliser une stratégie de protection/déprotection ne laissant libre que OH-6. Donc, il a suffi d'abord de protéger OH-6 à l'aide d'un éther silylé, par exemple, puis de protéger les alcools en C-2, C-3 et C-4 avec un groupement benzyle ou benzoyle. Le silyle installé en C-6 est déprotégé sélectivement, laissant OH-6 libre de toute modification. Quand R₁ est un groupement allyle, il faut éviter l'hydrogénolyse; le contraire lorsque R₁ est un groupe méthyle.

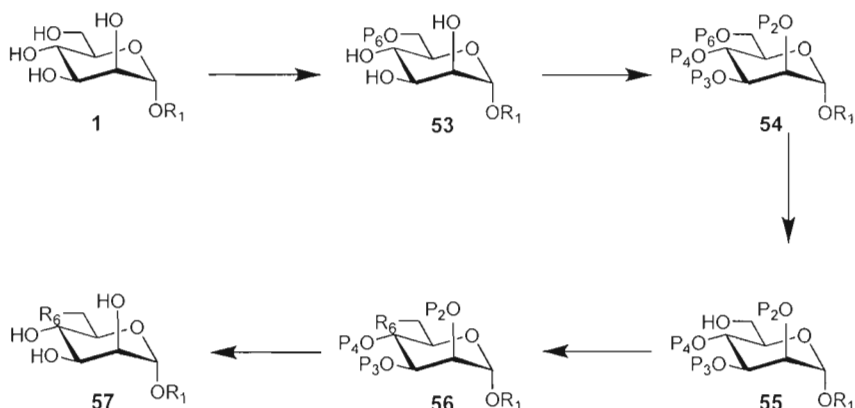


Schéma 2.28 Stratégie générale de modification de l'alcool en C-6 d'un mannopyrannoside.

La suite de la synthèse s'est continuée avec la série *O*-méthylée en C-1, pour faire suite aux synthèses précédentes. Par contre, après résultats des tests biologiques il s'est avéré que ManOAll est beaucoup plus actif que MeMan. C'est pourquoi dans les synthèses suivantes les modifications ont été apportées avec une série *O*-allylée en C-1.

2.2.3 α -D-Mannopyrannosides de méthyle

Tout d'abord, un éther silylé a été installé en C-6 pour en protéger le groupement alcool. Le choix de TBDPSCI n'est pas sans raison: l'alcool en C-6 étant primaire, sa vitesse de réaction est plus rapide lors de la protection; l'encombrement causé par les phényles et le *tert*-butyle du TBDPSCI empêche les alcools secondaires, plus encombrés que l'alcool primaire, de se faire protéger par l'éther silylé en question, et ce, même avec un assez long de temps de réaction.

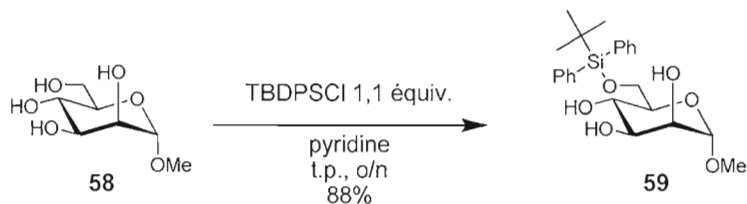


Schéma 2.29 Conditions de silylation sélective du mannopyrannoside **58**.

Le groupe hydroxyle protégé en C-6 et les autres alcools étant libres, l'étape suivante consiste à les protéger sous forme de benzyles.

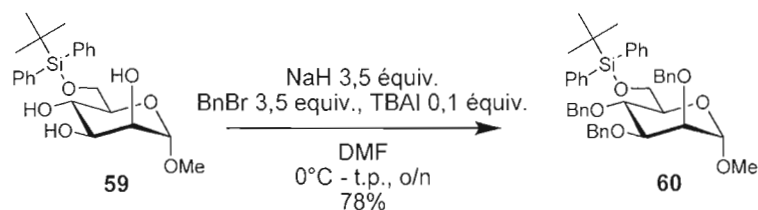


Schéma 2.30 Conditions de tri-*O*-benzylation du mannopyranoside **59**.

Il ne reste plus qu'à désilyler l'alcool en C-6 pour le retrouver sous forme d'alcool libre et qu'il soit possible d'effectuer des modifications.

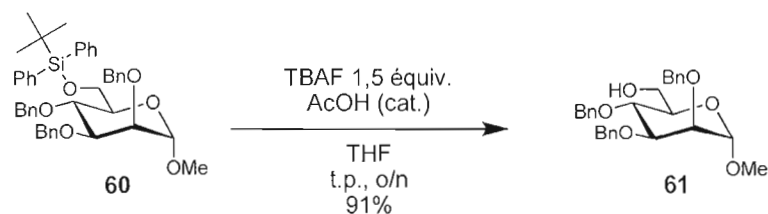


Schéma 2.31 Conditions de désilylation du mannopyranoside **60**.

Une première modification a été la sulfatation de l'alcool en C-6.

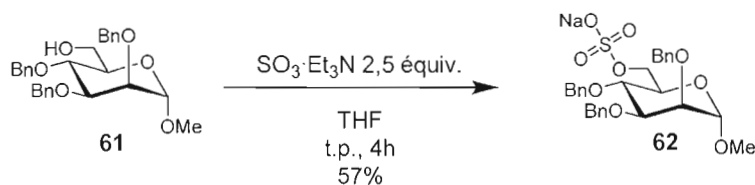


Schéma 2.32 Conditions de sulfatation du mannopyranoside **61**.

Il s'en suit une déprotection des benzyles par hydrogénolyse qui ne touche pas au groupe sulfonate ni au groupe O-méthyle en C-1.

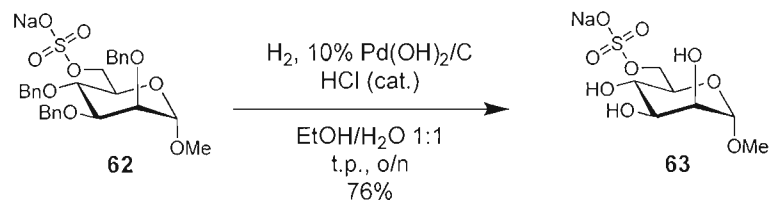


Schéma 2.33 Conditions d'hydrogénolyse du mannopyrannoside **62**.

Une seconde modification en C-6 est l'installation d'un phosphonate. Tout d'abord, une réaction de diéthylphosphatation a été faite.⁷⁷

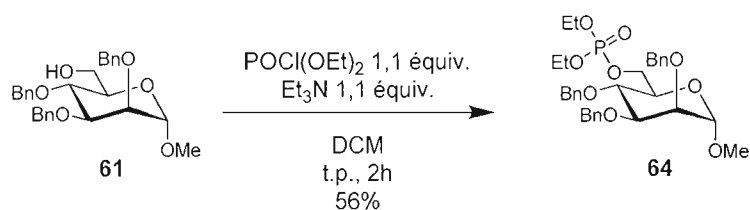


Schéma 2.34 Conditions de diéthylphosphatation du mannopyrannoside **61**.

Les deux groupes *O*-éthyles sont déprotégés en présence de TMSI formé *in situ* pour former, après parachèvement, le 6-phosphonate.^{78,79,80,81}

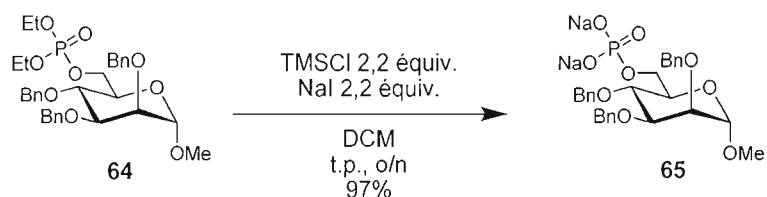


Schéma 2.35 Conditions d'hydrolyse du mannopyrannoside **64**.

Le mécanisme de désalkylation est décrit ici. En premier lieu, TMSI réagit avec l'ion iodure dans un équilibre favorisé vers la gauche pour former le TMSI *in situ*. Ce dernier

⁷⁷ Ahn, Y.-H., and Chung, S.-K., *Bull. Korean Chem. Soc.*, **2002**, 23, 515-517

⁷⁸ Khanjin N. A., and Montero, J.-L., *Tetrahedron Lett.*, **2002**, 43, 4017-4020

⁷⁹ Morita, T., Okamoto, Y., and Sakurai, H., *Tetrahedron Lett.*, **1978**, 28, 2523-2526

⁸⁰ Morita, T., Okamoto, Y., and Sakurai, H., *Bull. Chem. Soc. Jap.*, **1981**, 54, 267-273

⁸¹ Olah, G. A., Narang, S. C., Balaram Gupta, B. G., and Malhotra, R., *JOC*, **1979**, 44, 1247-1251

va réagir avec le solvant, l'acétonitrile, pour former un ion triméthylsilylnitrilium qui est encore plus réactif que le TMSI lui-même. Ce dernier va donc être attaqué par l'oxygène de l'éther d'alkyle pour former un *O*-silyle et un iodure d'alkyle avec départ d'une molécule d'acétonitrile. Le même processus est suivi par le second *O*-éthyle pour résulter en phosphate doublement silylé. Lors du traitement aqueux, une molécule d'eau vient attaquer les deux atomes de silicium pour libérer le phosphate.

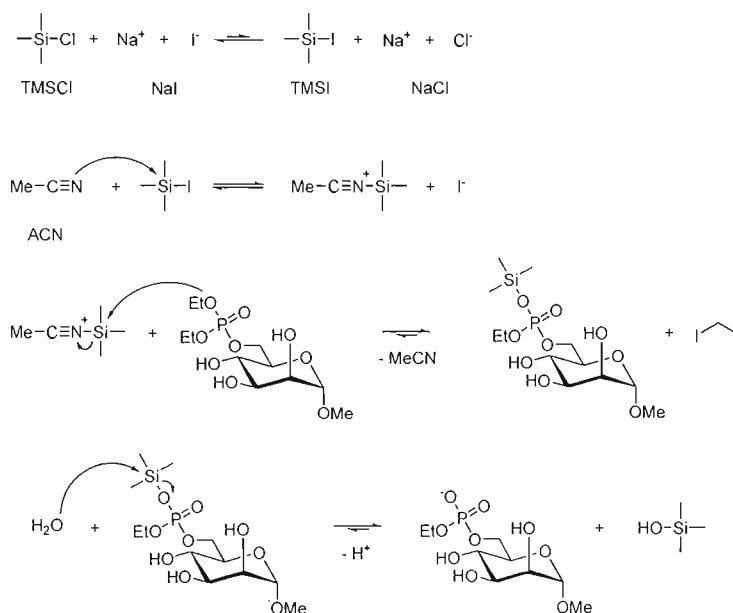


Schéma 2.36 Mécanisme de désalkylation de groupements éthyle.

L'étape finale consiste en une déprotection des benzyles par hydrogénolyse qui garde intact le groupe phosphonate et le groupe *O*-méthyle en C-1.

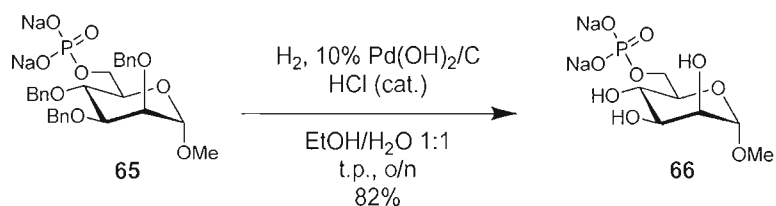


Schéma 2.37 Conditions d'hydrogénolyse du mannopyrannoside **65**.

Une méthode alternative aurait été d'utiliser la réaction de Lipták⁸² qui permet de déprotéger sélectivement un 4,6-*O*-benzylidène en 4-*O*-benzyle.

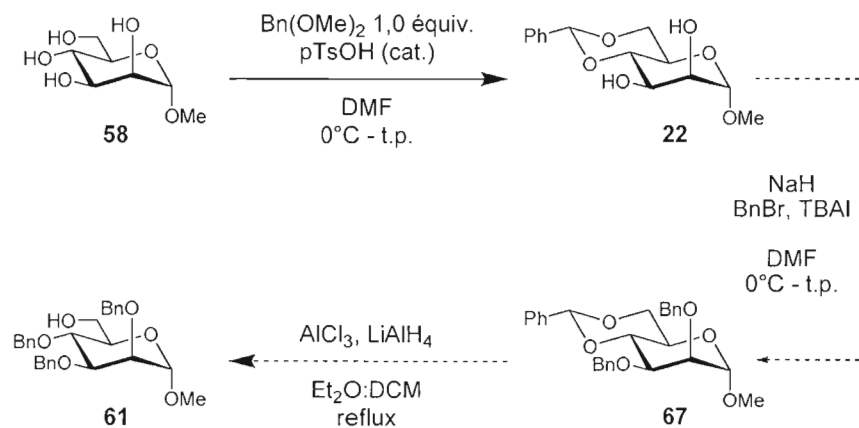


Schéma 2.38 Voie alternative à la silylation en C-6 du MeMan.

2.3.1 α-D-Mannopyrannosides d'allyle

Le ManOAll est une molécule bien simple, seulement deux carbones et deux hydrogènes de plus que le MeMan. Toutefois, son activité biologique vis-à-vis le FimH est presque multipliée par 26 000 fois par rapport au MeMan, soit le troisième meilleur inhibiteur potentiel synthétisé par Mohamed Touaibia.

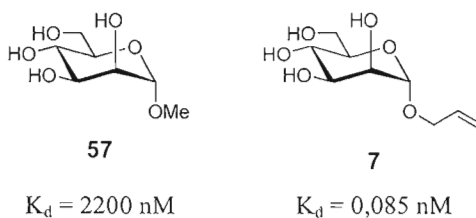


Figure 2.5 Comparaison entre l'activité biologique du α-D-mannopyrannoside de méthyle et du α-D-mannopyrannoside d'allyle.

⁸² Lipták, A., *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.*, **1979**, 99, 201-208

La différence d'activité biologique entre MeMan et ManOAll peut s'expliquer en observant les modèles moléculaires. Le groupement 1-*O*-allyle du ManOAll fait des interactions hydrophobes de type CH- π avec Ile52 et de type π - π avec Tyr48. De l'autre côté, le groupement 1-*O*-méthyle du MeMan fait des interactions de type CH-CH avec Ile52, mais aucune de type π - π avec Tyr48. Un autre point est le fait que le groupement *O*-allyle possède une plus grande surface de contact avec les résidus Ile52 et Tyr48 par rapport à l'*O*-méthyle. De plus, le groupement allyle étant plus flexible, il peut possiblement interagir avec Tyr137, ce qui est carrément impossible pour le MeMan sans sortir du site d'interaction.

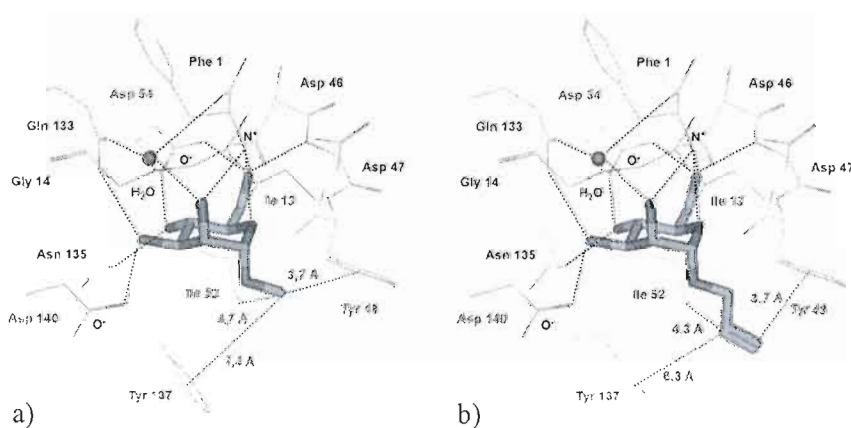


Figure 2.6 Modélisation moléculaire des interactions entre le FimH et a) MeMan b) ManOAll.

La première étape consiste en l'allylation en C-1 par la réaction de Fischer avec l'alcool allylique en milieu acide. Cette réaction mène à un mélange de produits: soit des α -/ β -D-mannopyranosides et des α -/ β -D-mannofurannosides. Le produit nettement majoritaire est l' α -D-mannopyranoside d'allyle à cause de l'effet.

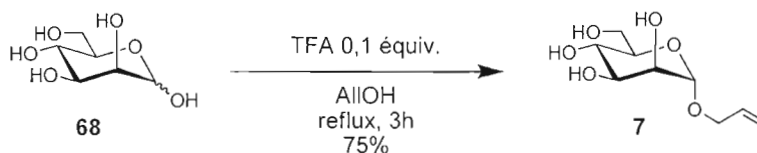


Schéma 2.39 Conditions de glycosidation de Fischer du mannopyrannoside **68**.

Le D-mannose, en équilibre constant entre sa forme ouverte et sa forme fermée, va subir une allylation en milieu acide. Après déshydratation, il y a formation du D-mannofurannoside de méthyle en équilibre avec ses formes ouvertes, α et β . Ensuite, la forme ouverte déjà allylée va subir une seconde allylation en milieu acide. Après perte d'une molécule d'alcool allylique, va se former d'abord le β -d-mannopyrannoside d'allyle (le produit cinétique). Cette dernière molécule est en équilibre avec l'anomère α en milieu acide *via* un ion oxocarbenium. Étant donné l'effet anomérique, c'est le dernier anomère qui sera à la toute fin favorisé (le produit thermodynamique).

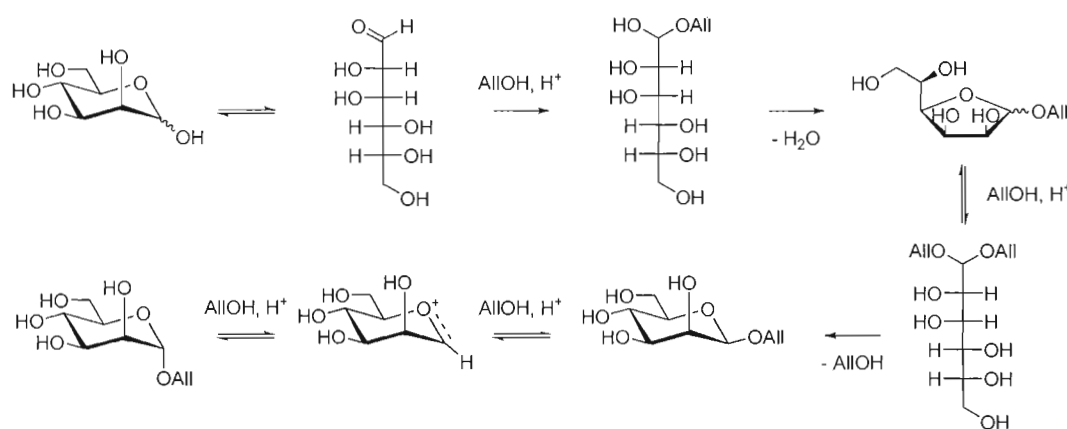


Schéma 2.40 Étapes de la glycosidation de Fischer du mannopyrannoside **68**.

L'effet endo-anomérique, appelé tout simplement effet anomérique, se définit comme étant la préférence d'un groupement électronégatif pour l'orientation axiale à la position anomérique (en C-1). Ce phénomène s'explique en fait de deux manières différentes.

D'abord, il y a rétrodonation d'une paire d'électrons libre (n) de l'oxygène endocyclique vers l'orbitale antiliante (σ^*) du lien C-1-O-1 ($n \rightarrow \sigma^*$). Cette résonance n'est

que possible ou très largement favorisée lorsque la configuration en C-1 est axiale; le recouvrement orbitalaire n'a pas lieu ou demeure très faible en configuration équatoriale. L'anomère α est en fait un produit thermodynamiquement favorisé, alors que l'anomère β est obtenu lors du contrôle cinétique.

D'un autre point de vue, il y a une forte répulsion entre les dipôles lorsque la configuration est équatoriale, ce qui défavorise l'anomère β d'un mannopyrannoside (ou d'un glucopyrannoside). Inversement, la configuration axiale empêche la répulsion entre les dipôles, ce qui favorise l'anomère α .

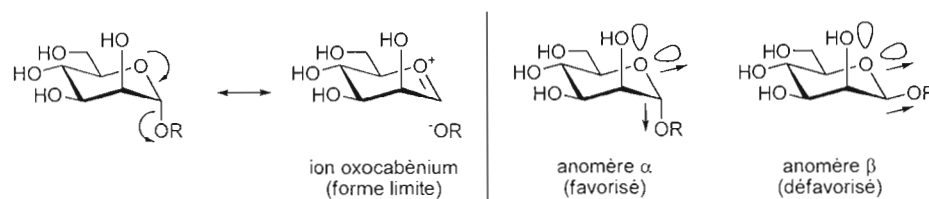


Schéma 2.41 Effet anomérique d'un D-mannopyrannoside.

Afin de purifier l' α -D-mannopyrannoside d'allyle (ou de méthyle) obtenu par la glycosylation de Fischer, il faut séparer les produits finaux et le produit de départ. Cette séparation est difficile directement puisque ces molécules polaires possèdent un facteur de rétention assez similaires. Afin de faciliter cette étape, une acétylation est préalablement effectuée et cela permet de réduire la polarité des molécules et d'avoir des facteurs de rétention un peu plus éloignés les uns des autres. Après séparation sur colonne de silice, une réaction de désacétylation dans les conditions de Zemplén est requise afin d'obtenir le sucre libre. Ces deux étapes de plus n'affectent pas tellement le rendement global de la synthèse puisque leur rendement respectif est presque quantitatif.

Le mécanisme de désacétylation dans les conditions de Zemplén est en fait une transestérification. Tout d'abord, le méthanolate de sodium, qui se trouve sous forme anionique, attaque un groupement acétyle pour former un alcoolate et l'acétate de méthyle. L'alcoolate ainsi formé va réagir ensuite avec le solvant, le méthanol, pour donner un alcool

et régénérer une molécule de méthanolate. Ce dernier peut attaquer un second groupe acétyle et ainsi de suite jusqu'à déprotection de tous les acétyles.

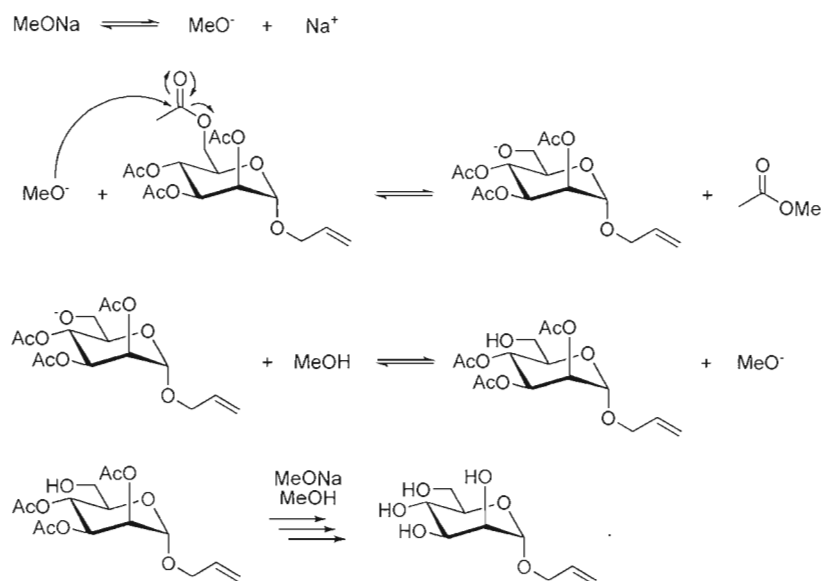


Schéma 2.42 Mécanisme de désacétylation dans les conditions de Zemplén.

Tout d'abord, un éther silylé a été installé en C-6 pour en protéger le groupement alcool primaire.

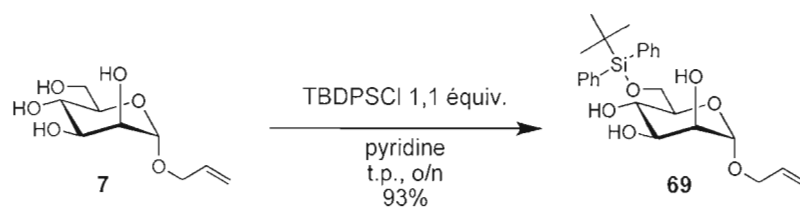


Schéma 2.43 Conditions de silylation du mannopyranoside 7.

Le groupe hydroxyle protégé en C-6 et les autres alcools étant libres, l'étape suivante consiste à les protéger sous forme d'acétyles.

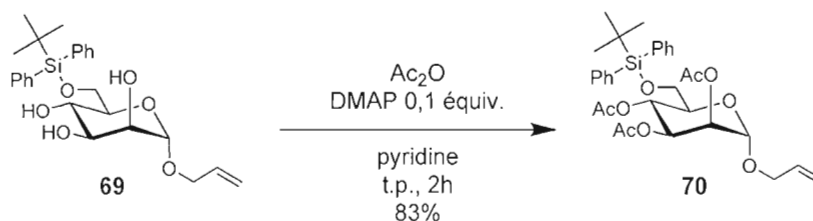


Schéma 2.44 Conditions d'acétylation du mannopyranoside **69**.

D'abord, il y a attaque du DMAP sur l' Ac_2O pour former un ion acétate et un cation acylpyridinium réactif. Un alcool libre du milieu vient attaquer ce dernier pour produire un groupement acétyle (un alcool protégé) et du DMAP protoné qui se fait déprotoner par la pyridine du milieu. Le DMAP est ainsi régénéré et peut recommencer l'acétylation d'un autre hydroxyle jusqu'à ce que tous les groupes alcools soient protégés.

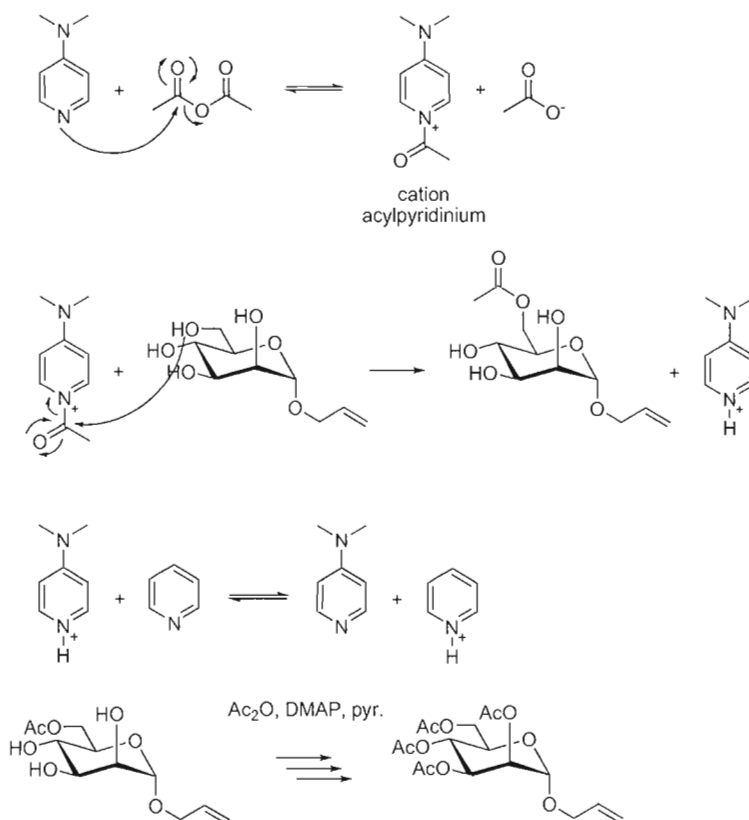


Schéma 2.45 Mécanisme d'acétylation avec Ac_2O et DMAP dans la pyridine.

Le clivage de l'éther silylé a lieu *via* un mécanisme S_N2 -Si où un ion fluorure attaque directement l'atome de silicium⁸³ pour provoquer le départ du fluorure de *tert*-butyldiphénylsilane et libérer un alcoolate. Ce dernier est protoné par l'acide acétique du milieu pour donner un groupement hydroxyle.

Par contre, la déprotection sélective de l'éther silylé en C-6 en présence de TBAF n'a pas été un succès. En effet, il y a eu migration du groupement acétyle en C-4 vers la position C-6, ce qui a donné en fait un mélange d'environ 1:1 de composés déprotégée en C-4 et C-6. Le phénomène de migration observé est dû à la basicité du TBAF qui déprotone l'alcool en C-6 et peut maintenant attaquer l'acétyle voisin. L'alcoolate en C-4 peut aussi bien attaquer l'acétate en C-6; il y a donc un équilibre en ces deux régioisomères et c'est pourquoi l'alcool en C-4 n'est pas le seul libéré. Ce glissement de groupe protecteur se fait jusqu'à ce qu'il n'y ait plus d'acétate voisin ou que l'acétate voisin soit en configuration *trans*. C'est pourquoi il n'a pas été observé de migration en C-3 ou C-2.

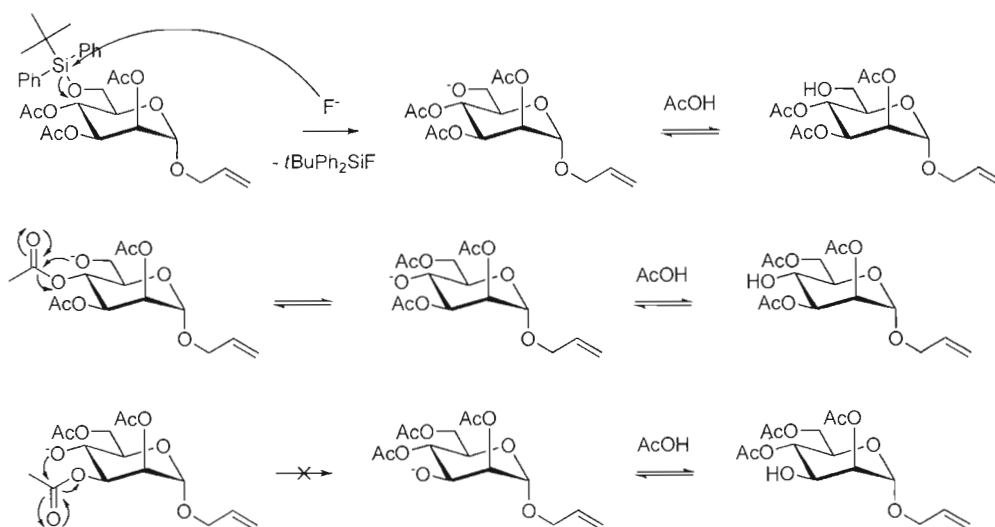


Schéma 2.46 Mécanisme de désilylation au TBAF suivi de migration d'acétyle.

Afin de contrer cet effet, les groupements acétyles ont été remplacés par des benzoyles qui n'entraînent pas de migration. En effet, la charge partielle positive du carbone

⁸³ Sommer, L. H., and Bauman, D. L., *JACS*, **1969**, 91, 7045-7051

du carbonyle est moindre sur le benzoyle que sur l'acétyle. Cela est dû au fait que cette charge est délocalisée sur toute la partie phényle du benzoyle, ce qui est stabilisant. Inversement, cette dernière est localisée sur un carbone dans le cas de l'acétyle, ce qui le rend plus enclin à subir une attaque nucléophile et, par conséquent, une migration. En fait, la délocalisation de la charge positive chez les benzoyles ralentit la vitesse des attaques nucléophiles à un tel point qu'elles ne se produisent pas.

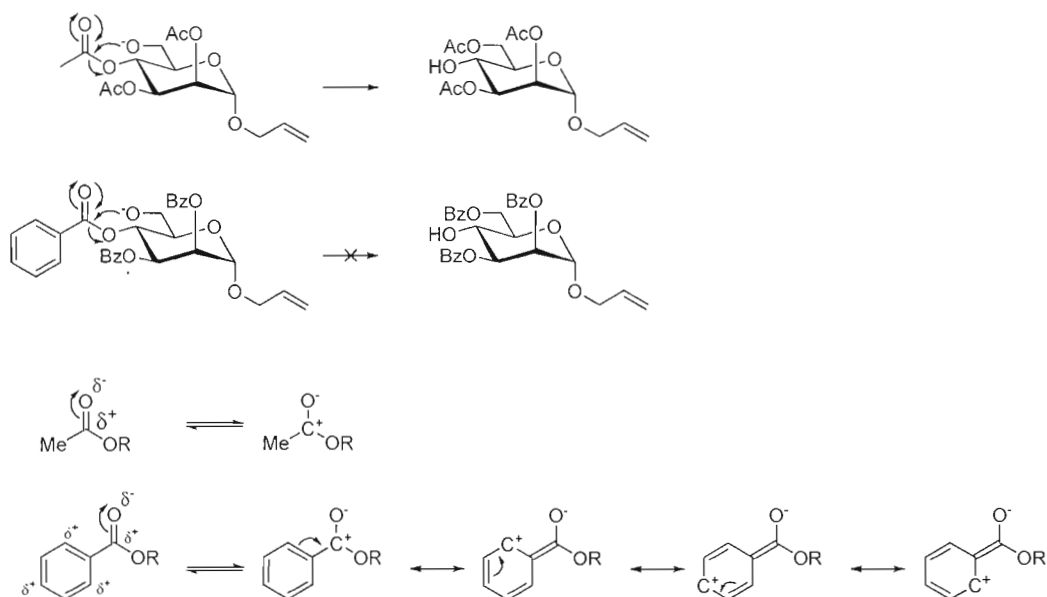


Schéma 2.47 Différence de réactivité entre les groupements acétyles et benzoyles.

Tel que mentionné ci-haut, comme alternative à l'acétylation, les trois alcools étant libres ont été protégés sous forme de benzoyles.⁵⁸

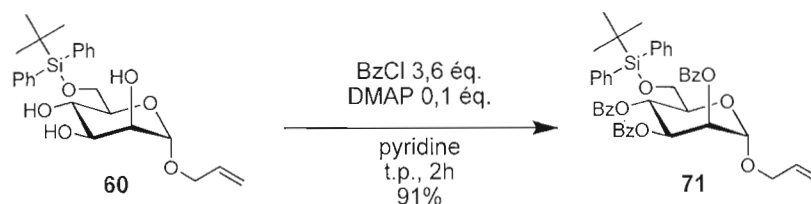


Schéma 2.48 Conditions de benzoylation du mannopyrannoside **60**.

Suivit de la désilylation de l'éther silylé en C-6 pour retrouver l'alcool primaire.

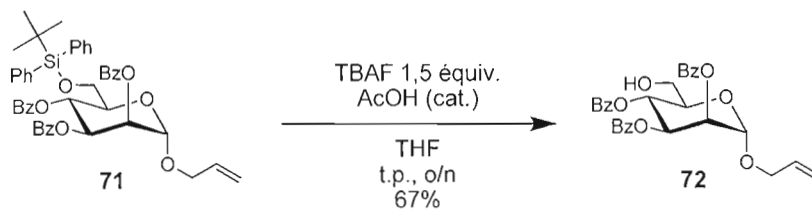


Schéma 2.49 Conditions de désilylation du mannopyranoside **71**.

Il s'en suit une sulfatation de l'alcool en C-6.

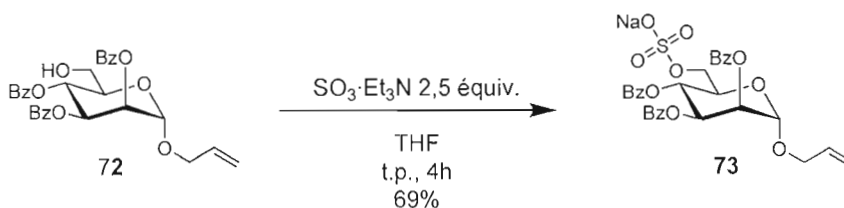


Schéma 2.50 Conditions de sulfatation du mannopyranoside **72**.

Puis une désacétylation dans les conditions de Zemplén.

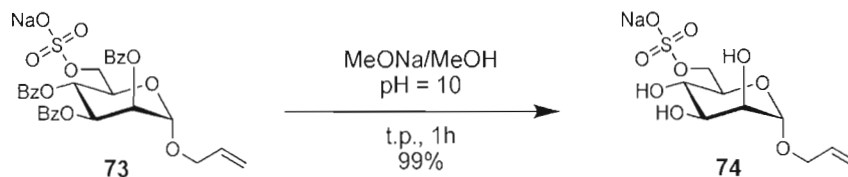


Schéma 2.51 Conditions d'hydrogénolyse du mannopyranoside **73**.

Une seconde modification a été la diéthylphosphatation.⁷⁷

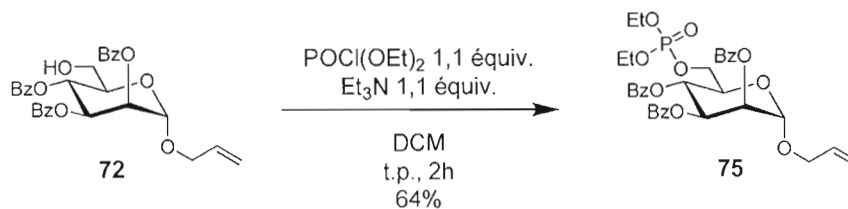


Schéma 2.52 Conditions de diéthylphosphatation du mannopyranoside **74**.

Toutefois, la désalkylation des groupements *O*-éthyles en phosphonate n'a pas fonctionné tel que prévu, vu la présence du groupement *O*-allyle.^{78,79,80,81}

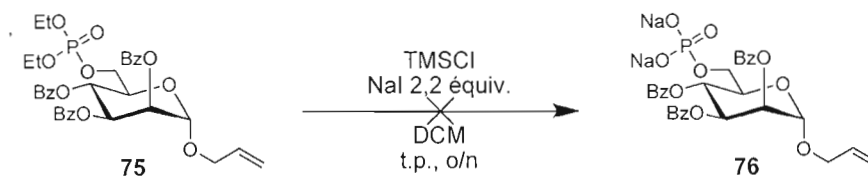


Schéma 2.53 Hydrolyse souhaitée du mannopyrannoside 75.

En fait, ce qu'il est arrivé est la déprotection du groupement *O*-allyle:

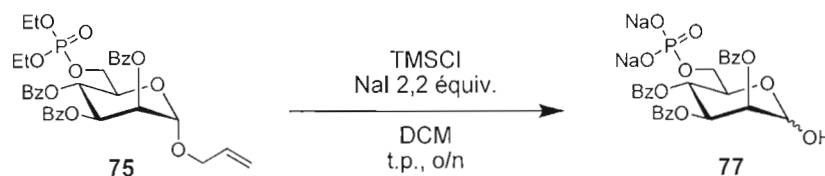


Schéma 2.54 Hydrolyse réelle du mannopyrannoside 75.

Pour contrer cette réaction non-souhaitable, il faudrait tout simplement réinstaller le groupement *O*-allyle par une glycosidation de Fischer.

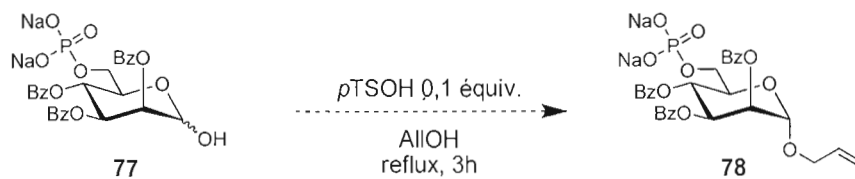


Schéma 2.55 Conditions de glycosidation de Fischer du mannopyrannoside 77.

Ici aussi, la déprotection des benzoyles se ferait dans les conditions de Zemplén.

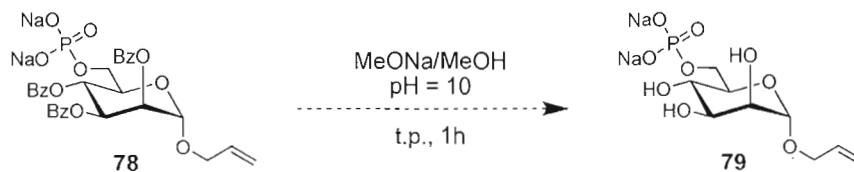


Schéma 2.56 Conditions de déprotection du mannopyrannoside 78.

2.3.1 α -D-Rhamnopyrannosides d'allyle

La première modification de la série des rhamnosides consiste en la désoxygénation du groupement hydroxyle en C-6. Pour cela, il faut d'abord faire une réaction de désoxygénation-iodation en présence d'imidazole, de triphénylphosphine et de diiode.⁸⁴

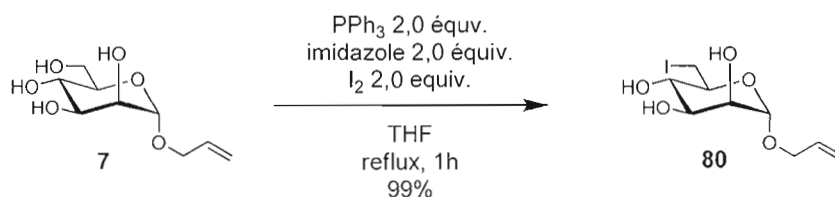


Schéma 2.57 Conditions de désoxygénation-iodation du mannopyrannoside 7.

Le mécanisme de cette réaction débute par l'activation de la triphénylphosphine qui attaque le diiode. Ensuite, l'alcool primaire déprotoné par l'imidazole attaque l'ion iodotriphénylphosphonium pour libérer de l'iodure. Cet ion iodure va par la suite attaquer en C-6 pour former l'iodure primaire et libérer de l'oxyde de triphénylphosphine.

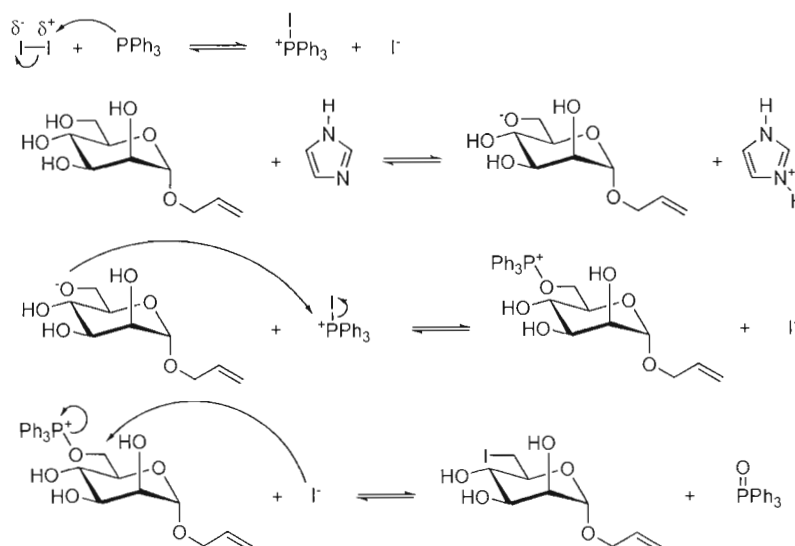


Schéma 2.58 Mécanisme de désoxygénation-iodation d'un alcool primaire

⁸⁴ Fauré, R., Shiao, T. C., Damerval, S., and Roy, R., *Tetrahedron Lett.*, **2007**, 48, 2385-2388

Le 6-désoxy-6-iodo- α -D-rhamnopyranoside d'allyle est mis en présence de Bu_3SnH et d'un initiateur radicalaire.^{84,85} Le groupement iodométhyle est ainsi converti en méthyle.

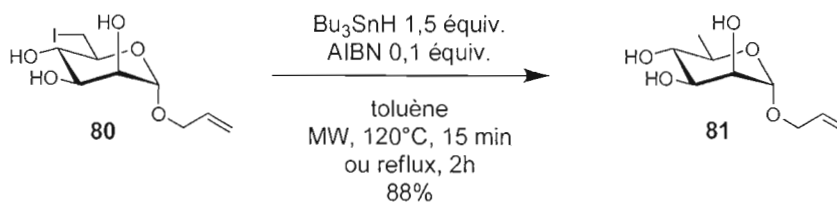


Schéma 2.59 Conditions de désiodation radicalaire du rhamnoside 80.

Tout d'abord, il y a scission homolytique de l'initiateur radicalaire, ici l'AIBN, pour libérer de l'azote moléculaire et deux radicaux carbonés. Ces derniers vont réagir avec le Bu_3SnH pour produire de l'étain radicalaire. Puis la propagation suit avec l'attaque de l'étain radicalaire sur l'iode pour former un autre radical carboné. Ce dernier attaque le Bu_3SnH pour former un groupement méthyle et générer un autre radical étain.

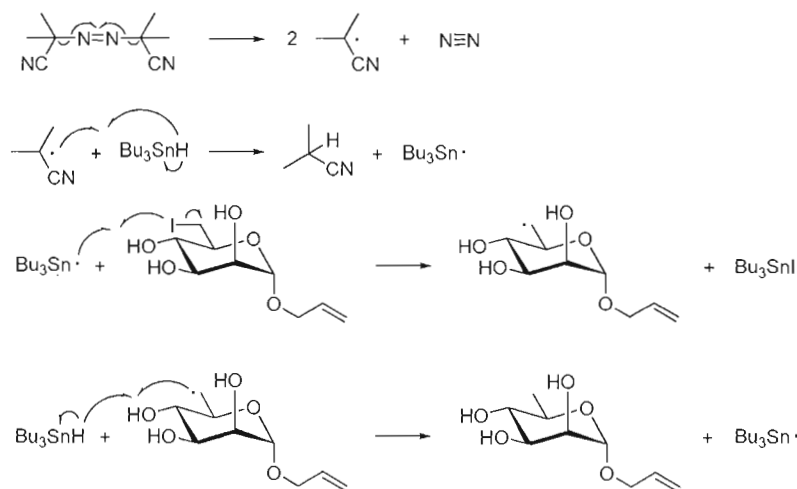


Schéma 2.60 Mécanisme de désiodation radicalaire.

La protection sélective d'OH-6 se fait en deux étapes. D'abord une 2,3:4,6-di-*O*-isopropylidénation en présence d'acétone et d'une trace d'acide.

⁸⁵ Srivastava, G., Alton, G., and Hindsgaul, O., *Carb. Res.*, **1990**, 207, 259-276 (1990)

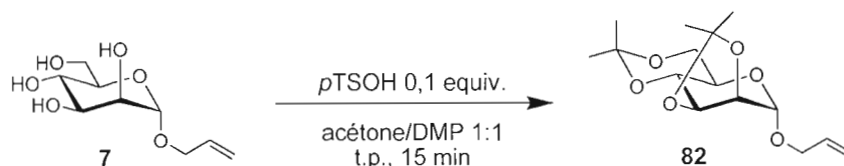


Schéma 2.61 Conditions de 2,3:4,6-di-*O*-isopropyldénation du mannopyrannoside **7**.

Ensuite, le groupement 4,6-*O*-isopropylidène est sélectivement enlevé pour ne laisser que le 2,3-*O*-isopropylidène.

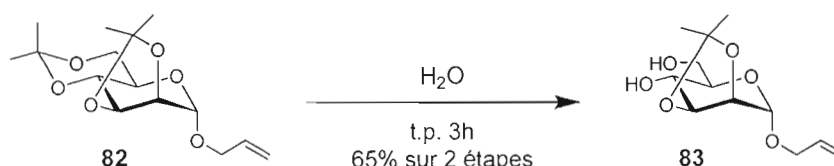


Schéma 2.62 Conditions de désisopropyldénation sélective du mannopyrannoside **82**.

Les groupements OH-2 et OH-3 étant protégés, il ne reste que OH-4 et OH-6 pour réagir à la désoxyfluoruration. L'hydroxyle en position C-4 étant beaucoup moins réactif que celui en C-6 (il est secondaire et gêné stériquement), il est donc possible de ne faire réagir que l'alcool primaire.

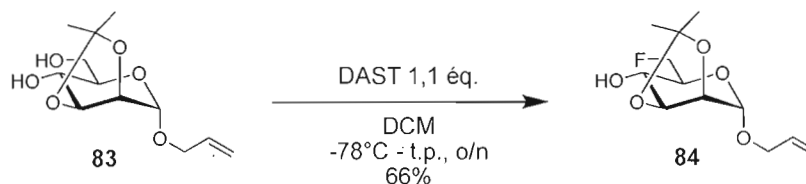


Schéma 2.63 Conditions de désoxymonofluoruration du mannopyrannoside **83**.

Le DAST est un réactif utilisé à la fois comme source d'ions fluorure et comme agent de désoxygénation. L'atome d'azote, riche en électrons, va donner son doublet libre à l'atome de soufre, ce qui va causer le départ d'un ion fluorure. Par la suite, l'oxygène d'une fonction alcool va attaquer le soufre et l'azote va retrouver la charge nulle. Après déprotonation, l'ion fluorure vient attaquer le carbone portant l'alcool en question, le retour de charge se fait sur l'atome de soufre qui va libérer un second ion fluorure. De cette manière, l'atome d'oxygène de l'alcool est carrément arraché par le soufre pour former un sulfoxyde, ce qui donne finalement le composé fluoré désiré. Étant donné la présence de fluorures, il est donc impossible de protéger les autres fonctions alcools par des silyles.

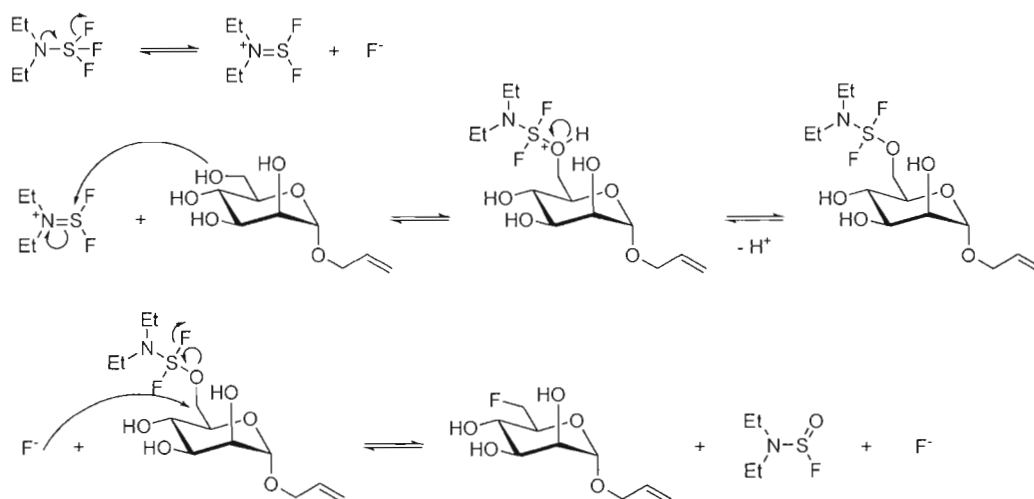


Schéma 2.64 Mécanisme de désoxyfluoruration d'un alcool primaire avec le DAST.

En utilisant le DAST, le milieu doit être parfaitement anhydre pour ne pas dégrader le réactif et éviter de libérer des ions fluorures. Chaque molécule de DAST libère deux ions fluorures, soit deux équivalents d'HF dans le ballon réactionnel.

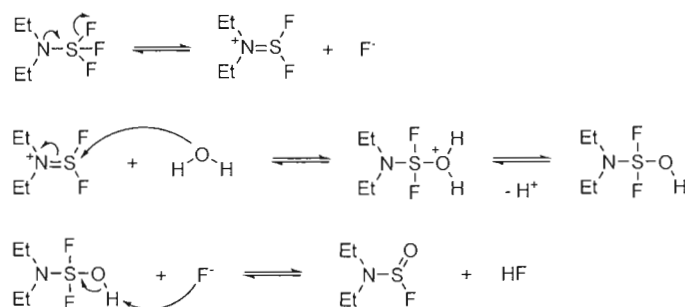


Schéma 65. Mécanisme de dégradation du DAST avec l'eau.

La déprotection de l'isopropylidène se fait en conditions acides.

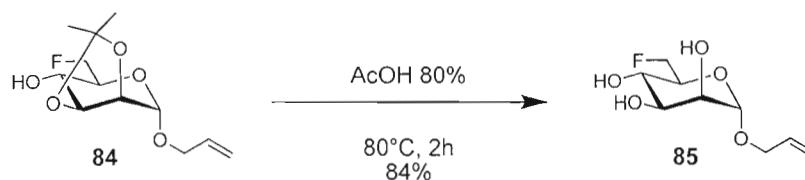


Schéma 2.66 Conditions de désisopropylidénation du rhamnoside **84**.

Afin de synthétiser le composé difluoré en C-6, il aurait fallu d'abord faire une oxydation de Swern pour passer de l'alcool primaire à l'aldéhyde.⁸⁶

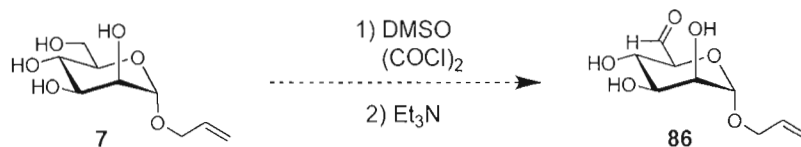


Schéma 2.67 Oxydation de Swern sur le mannopyrannoside 7.

Puis la désoxydifluoruration aurait lieu avec le DAST.⁸⁷

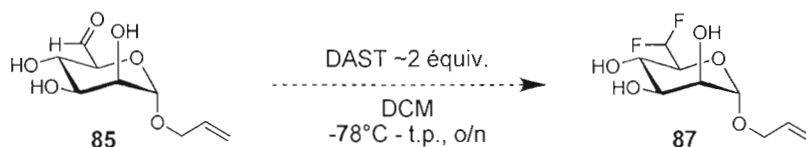


Schéma 68. Désoxydifluoruration du mannopyrannoside 85.

Pour faire le composé trifluoré, il aurait fallu d'abord oxyder l'alcool primaire en acide carboxylique à l'aide de TEMPO en présence de BAIB.

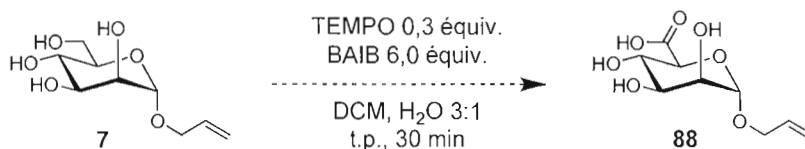


Schéma 2.69 Oxydation avec TEMPO du mannopyrannoside 7.

⁸⁶ Peri, F., Jiménez-Barbero, J., García-Aparicio, V., Tvaroška, I., and Nicotra, F., *Chem. Eur. J.*, **2004**, 10, 1433-1444

⁸⁷ C., C.-W. T., X. H., Chen, and Liu, H.-W., *JACS*, **1998**, 120, 9698-9699

Puis la désoxytrifluoration aurait lieu avec le Deoxo-Fluor.⁸⁸

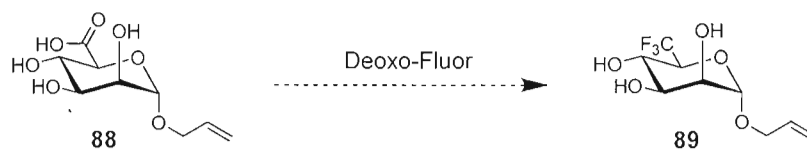


Schéma 2.70 Désoxytrifluoration du mannopyrannoside **88**.

⁸⁸ Lal, G. S., Pez, G. P., Pesaresi, R. J., Prozonc, F. M., and Cheng, H., *JOC*, **1999**, 64, 7048-7054 (1999)

CHAPITRE III

DÉVELOPPEMENT D'UN MODÈLE QSAR

3.1 INTRODUCTION AUX INTERACTIONS INTERMOLECULAIRES

Dans l'univers, la matière serait gouvernée par seulement quatre forces fondamentales: la gravitation, la force nucléaire forte, la force nucléaire faible et la force électromagnétique. Ces forces universelles agissent à l'échelle astronomique, atomique et subatomique. La gravitation attire les masses, alors que la force nucléaire faible est responsable de la désintégration β . La force nucléaire forte maintient les quarks ensemble pour former protons et neutrons et maintient aussi ces derniers ensemble pour former les noyaux atomiques. C'est la force électromagnétique qui maintient les électrons avec les noyaux et par conséquent est responsable des interactions intra- et intermoléculaires.

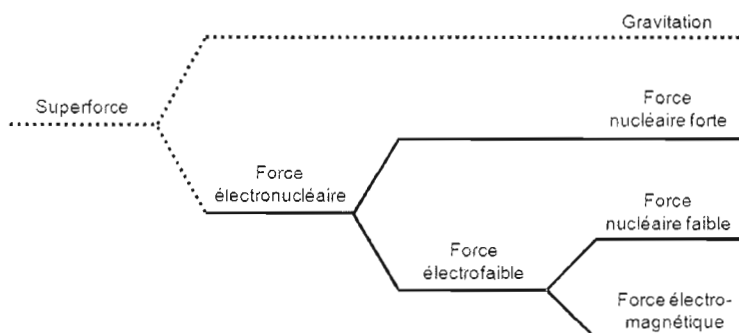


Figure 3.1 Les forces fondamentales selon la théorie du Tout.

La force électromagnétique est décrite par la loi de Coulomb et son intensité est inversement proportionnelle au carré de la distance entre deux charges. Lorsque deux charges de signe différent (+ et -) se rencontrent, elles s'attirent; alors que deux charges de même signe (+/+ ou -/-) se repoussent. Une molécule qui possède autant de protons que d'électrons est électriquement neutre (sa charge globale est nulle). Toutefois, la densité électronique autour d'une molécule laisse des charges nettes ou partielles, ce qui rend la molécule en question (ou des régions de cette molécule) plus ou moins polaires.

Lorsque la différence d'électronégativité entre deux atomes est supérieure à 1,7 sur l'échelle de Pauling, il y a arrachement d'un électron et l'atome le plus électronégatif devient un anion et l'autre un cation. Chez les résidus d'acides aminés, les ponts salins se forment souvent entre l'arginine ou la lysine (qui sont cationiques) et l'aspartate ou le glutamate (qui sont anioniques).

Dans une interaction ion-dipôle, le partage électronique est presque égal entre les deux atomes avec une faible différence d'électronégativité. Ce genre d'interaction peut être une liaison de coordination ou complexation métallique et a lieu entre des groupes carbonyles et un ion calcium, dans les éthers-couronnes ou bien dans la solvation d'ions.

Quand une molécule possède des atomes électronégatifs (oxygène, azote...) il se crée des dipôles permanents. Cette dernière veut neutraliser ses charges partielles avec ses semblables en faisant des interactions dipôle-dipôle. Les plus importants sont les ponts hydrogène où un donneur d'hydrogène (O-H ou N-H) interagit avec un accepteur d'hydrogène (O ou N). La liaison hydrogène est en fait un cas limite causée par les forces de Van der Waals.

Dans le cas où une molécule possède plusieurs couches électroniques et devient par conséquent polarisable, il se crée donc des dipôles instantanés. Les forces de Van der Waals, ou forces de dispersion de London, sont en jeu dans ce qui sont appelées les interactions hydrophobes.

Des quatre catégories d'interactions intermoléculaires présentées brièvement ci-haut, les plus intéressantes au point de vue des complexes protéines-ligand sont les ponts H et les interactions hydrophobes (notamment avec les aromatiques). Plus faibles que les interactions ioniques ou qu'une liaison covalente, les ponts hydrogène possèdent une énergie pouvant aller entre 0,4 kJ/mol jusqu'à 250 kJ/mol.⁸⁹

⁸⁹ Nishio, M., Umezawa, Y., Honda, K., Tsuboyamad, S., and Suezawa, H., *Cryst. Eng. Comm.*, **2009**, 11, 1757-1788

Pour ce qui est des ponts hydrogène, il en existe à ce jour quatre types⁸⁹: XH-X (de 12 à 30 kJ/mol), XH- π (de 8 à 16 kJ/mol), CH-X (de 8 à 16 kJ/mol) et CH- π (de 6 à 10 kJ/mol). Ici, « X » représente un atome électronégatif, le plus souvent O ou N dans les systèmes biologiques, mais peut être aussi F, Cl, Br ou I. Les interactions XH- π , CH-X et CH- π possèdent une énergie de l'ordre de grandeur des forces de Van der Waals plutôt que celle des forces électrostatiques comme dans le cas des ponts H de type XH-X.

Liaison hydrogène	Énergies de liaison	Distances types	Angles types	Exemples
Forte	30 à 250 kJ/mol	1,2 à 2,5 Å	175-180°	F-H...F ⁻ OH...O ⁻
Modérée	16 à 30 kJ/mol	2,5 à 3,2 Å	130-180°	O/N-H...O=C O/N-H...O/N
Faible	0,4 à 16 kJ/mol	3,2 à 4,0 Å	90-150°	C-H...O/N O/N-H... π C-H... π

Tableau 3.1 Énergies, distances et angles types de différents ponts hydrogènes.

Les liaisons hydrogène les plus rencontrées dans les molécules organiques sont de type modéré. Ce sont en fait les interactions entre les acides durs et les bases dures qui tendent à former des ponts H, alors que les acides mous et les bases molles préfèrent les interactions de Van der Waals. Les acides durs qui possèdent un bas pKa partagent plus facilement leur hydrogène avec une base molle et inversement pour les bases molles. Cela explique la tendance O-H...N > O-H...O > N-H...O > N-H...N en termes de force des ponts H. Une des caractéristiques des liaisons hydrogènes, c'est qu'elles sont directionnelles (avec des angles types) un peu comme les liaisons covalentes qui sont très directionnelles, mais inversement aux interactions de Van der Waals qui ne le sont peu ou pas du tout.

Il y existe plusieurs types d'interactions hydrophobes: CH-CH, arène-arène, CH-arène, S-arène, π -cation^{90,91} et plus rarement n- π et π -anion. Les plus intéressantes au niveau d'un système biologique sont celles qui impliquent un noyau aromatique, notamment les interactions arène-arène. Un noyau aromatique est en fait un quadrupôle (2 charges + et 2 charges -) qui peut interagir avec lui-même de trois manières principales: le T-*stacking*, le π -*stacking* et plus rarement les interactions d'un arène avec un composé perfluoroaromatique.

T- <i>stacking</i> (<i>edge-to-face</i>)	π <i>stacking</i> (<i>displaced face-to-face</i>)	π -perfluoroaromatique (<i>face-to-face</i>)

Tableau 3.2 Exemples types d'interactions arène-arène
(tiré directement de l'article de Waters).⁹²

Toutes les interactions décrites plus haut sont retrouvées chez les complexes protéine-ligand (certaines plus rarement). Dans une protéine donnée, certains résidus d'acides aminés participent à des interactions non-covalentes. La phénylalanine, le tryptophane et la tyrosine sont aromatiques et peuvent faire des interactions CH- π , XH- π , arène-arène, S-arène ou encore π -cation. L'arginine et la lysine se retrouvent sous forme cationique en milieu physiologique et peuvent participer à des ponts salins (avec l'aspartate ou le glutamate) ou des interactions π -cation. La cystéine, la méthionine ou un pont disulfure peut interagir avec un composé aromatique, *via* un atome de soufre, dans une interaction de type S-arène.

⁹⁰ Ma, J. C., and Dougherty, D. A., *Chem. Rev.*, **1997**, 97, 1303-1324

⁹¹ Dougherty, D. A., *The Journal of Nutrition*, **2007**, 137, 1504s-1508s

⁹² Waters, M. L., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2002**, 6, 736-741

3.2 MINIMISATION DE L'ÉNERGIE À L'AIDE DE FORECASTER 2.5

Beaucoup de processus biologiques impliquent des interactions protéine-ligand et leur dysfonctionnement est à l'origine de maladies. C'est pourquoi en chimie thérapeutique on cherche à lier de petites molécules organiques à un récepteur cible. Avec l'évolution rapide de l'informatique, la modélisation moléculaire a été développée comme un important outil de recherche. L'arrimage moléculaire ou *docking* est une méthode par laquelle il est possible de simuler de quelle manière une molécule organique devrait se lier à un récepteur pour former un complexe stable.

Au tout début de la modélisation moléculaire, la protéine et le ligand étaient considérés comme des entités rigides, le modèle ainsi obtenu par arrimage moléculaire rigide était limité. Puis des preuves expérimentales ont permis de comprendre que la flexibilité jouait un rôle très important dans les interactions protéine-ligand.⁹³ Ici, on ne parle pas d'un côté de la flexibilité de la protéine et de l'autre côté de la flexibilité du ligand, mais bien de la flexibilité de la protéine *avec* le ligand ou de la flexibilité du complexe protéine-ligand, les deux ensemble. En fait, c'est que l'approximation de l'équation « protéine minimisée + ligand minimisé = complexe minimisé » n'est pas représentative de la complexité du phénomène. L'arrimage moléculaire rigide a donc évolué en arrimage moléculaire flexible, améliorant ainsi la précision des modèles de prédictions.⁹³

Après l'arrimage moléculaire flexible, a été développé l'arrimage flexible tenant compte des molécules d'eau qui sont très importantes dans le phénomène d'interactions protéine-ligand, dans le but d'augmenter la précision. Par contre, quelques structures de complexes protéines-ligand doivent être connues initialement, ce qui n'est pas le cas de la majorité des problèmes étudiés, souvent un seul complexe protéine-ligand est connu. Seulement quelques logiciels en modélisation moléculaire possèdent la caractéristique de tenir compte de la flexibilité et des molécules d'eau; la majorité considérant un récepteur rigide sinon les autres un récepteur flexible seulement, sans les molécules d'eau.

⁹³ Moitessier, N., Henry, C., Maigret, B., and Chapleur, Y., *J. Med. Chem.*, **2004**, 47, 4178-4187

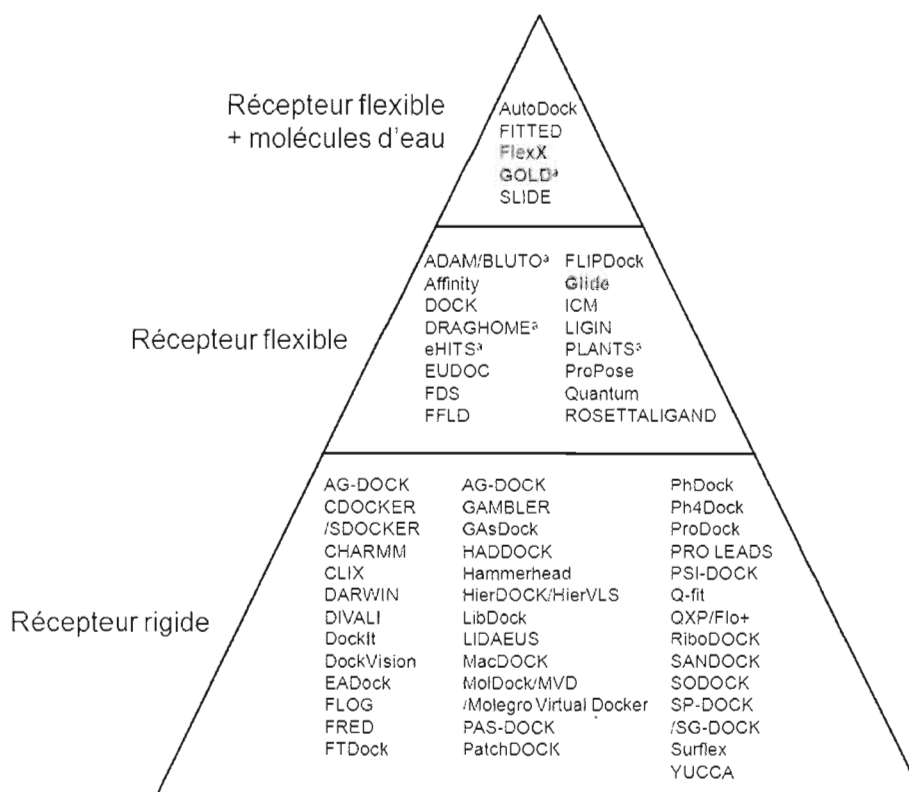


Figure 3.2 Comparaison de différents logiciels en modélisation moléculaire.

^a Récepteur flexible localement seulement. Les logiciels dans le haut de la pyramide ne sont pas nécessairement les plus performants. Les 3 logiciels faisant partie du *top 4* des meilleurs logiciels selon Moitessier sont écrits en **rouge**.
(Données tirées de la revue de Moitessier)⁹⁴

Par contre, ce n'est pas parce qu'un logiciel utilise un arrimage moléculaire flexible tenant compte des molécules d'eau qu'il est nécessairement plus efficace. Dans sa revue⁹⁴, Moitessier affirme que les meilleurs logiciels d'arrimage moléculaire en termes de précision de la prédiction sont MVP, Glide, GOLD et FlexX. Avec Glide, les molécules d'eau ne sont pas considérées; alors qu'il n'y a pas d'information à ce sujet pour MVP. Toutefois, on peut affirmer qu'au moins 50% des 4 logiciels les plus performants mentionnés dans la revue de Moitessier tiennent compte de la flexibilité du récepteur et des molécules d'eau.

⁹⁴ Moitessier, N., Englebienne, P., Lee, D., Lawandi, J., and Corbeil, C. R., *Brit. J. Pharmacol.*, **2008**, 153, S7-S26

Le logiciel de modélisation moléculaire idéal est simple d'utilisation, rapide (demande des temps de CPU courts), donne des prédictions précises qui sont représentatives de la réalité (des structures rayons-X), économique et nécessite l'équipement informatique accessible à tous. C'est dans cette optique qu'a été développé le logiciel FITTED^{94,95,96,97,98} par Nicolas Moitessier et son équipe à l'université McGill. Ce logiciel est en fait basé sur un algorithme génétique de type Lamarckien qui fait évoluer des chromosomes dans un processus d'apprentissage vers la convergence d'une propriété donnée (l'énergie).

Le fait d'utiliser un algorithme génétique permet de simplifier grandement le problème en le décomposant en éléments bien simples. Un complexe protéine-ligand devient donc un ensemble d'angles de torsion, de translations, d'orientations... Différentes stratégies ont été mises en œuvre lors de la conception du logiciel pour gagner du temps et réduire le temps de calcul du CPU. En fait, FITTED utilise une méthode d'analyse stochastique (aléatoire) plutôt que systématique. Avec cette dernière méthode de calculs, dans un système où il y a 3 liens rotatifs, par exemple, l'analyse énergétique des angles de torsion avec des pas de 15° (soit 1/24 de cercle) donne déjà $24^3 = 13\,824$ possibilités. Une méthode stochastique permet d'éviter de complexifier le problème d'une manière exponentielle, et donc de réduire de beaucoup le temps de calcul. D'autres stratégies ont été mises en œuvre pour réduire le temps de calcul avec FITTED: soit des étapes d'optimisation intermédiaires⁹⁹, la troncation de la protéine (ce qui enlève des résidus d'acides aminés qui ont peu d'influence sur le ligand) et la représentation unie des atomes (*united atom representation*).¹⁰⁰

⁹⁵ Fitted.ca ©2010 <http://www.fitted.ca> [Consulté le 2 avril 2010]

⁹⁶ Corbeil, C. R., Englebienne, P., and Moitessier, N., *J. Chem. Inf. Model.*, 2007, 47, 435-449

⁹⁷ Englebienne, P., Fiaux, H., Kuntz, D. A., Corbeil, C. R., Gerber-Lemaire, S., Rose, D. R., and Moitessier, N., *Proteins*, 2007, 69, 160-176

⁹⁸ Corbeil, C. R., Englebienne, P., Yannopoulos, C. G., Chan, L., Das, S. K., Bilimoria, D., L'Heureux, L., and Moitessier, N., *J. Chem. Inf. Model.*, 2008, 48, 902-909

⁹⁹ Moitessier, N., Therrien, E., and Hanessian, S., *J. Med. Chem.*, 2006, 49, 5885-5894

¹⁰⁰ Moitessier, N., Westhof, E., and Hanessian, S., *J. Med. Chem.*, 2006, 49, 1023-1033

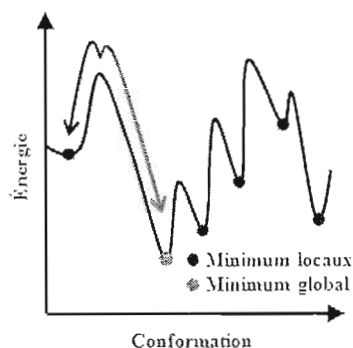


Figure 3.3 Minimisation de l'énergie vers le minimum global ou local.

Dans un système complexe, idéalement il faudrait atteindre la valeur du minimum d'énergie global (flèche rouge), qui représente l'état le plus stable du complexe protéine-ligand, par exemple. De manière plus pratique et étant donné que les possibilités d'angles de torsion, de translations, d'orientations sont quasi-infinies, le but est de trouver un minimum d'énergie local qui s'approche le plus du minimum global. En fait, en minimisant l'énergie du système sans méthode systématique ni stochastique, c'est habituellement le minimum local d'énergie le plus proche qui est trouvé (flèche bleue).

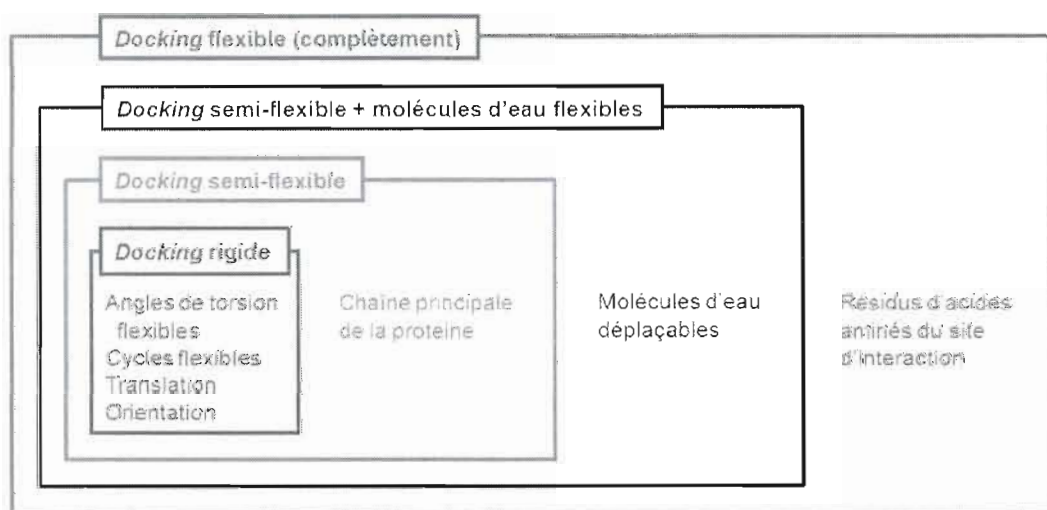


Figure 3.4 Les différents modes d'arrimage moléculaire de FITTED 2.5 et les paramètres tenus en compte (Tiré directement du manuel d'utilisateur).¹⁰¹

¹⁰¹ Moitessier, N., Corbeil, C., et Englebiene, P., FITTED 2.6 User Guide, Montréal, 2008, 86 pages

2.3.1 Utilisation de ProCESS

En premier lieu, il suffit d'avoir les fichiers PDB des complexes protéine-ligand d'intérêt. Dans le cas du FimH, les fichiers .pdb des structures 1KIU, 1KLF, 1TR6, 1UWF et 2VCO ont été téléchargés directement sur le site Internet de PDB.¹⁰² Pour toutes ces structures, les molécules d'eau ont été supprimées (sauf celles d'intérêt) ainsi que les ligands et les métaux (si tel était le cas). Puisque les atomes d'hydrogène sont invisibles aux rayons-X, ils ont été ajoutés à l'aide du logiciel MOE 2007.09.¹⁰³ Les charges partielles ont été calculées à l'aide du champ de force approprié puis les atomes d'hydrogène minimisés. Le résidu d'acide aminé Asp133 de la structure PDB 1KIU a été muté manuellement en glutamate et minimisé. De cette manière, les cinq structures du FimH possèdent le même nombre d'atomes total, les mêmes noms pour chacun des atomes, le même nombre d'atomes par résidus d'acides aminés, les mêmes noms de résidus d'acides aminés et le même nombre de molécules d'eau. Par conséquent, ProCESS n'a pas affiché de message tel que décrit dans le guide d'utilisateur de FITTED 2.6.¹⁰¹ Pour ce qui est du ligand, le fichier 1uwf.pdb a été ouvert avec MOE, le récepteur, toutes les molécules d'eau, les ligands (sauf le mannopyranoside d'intérêt) et les métaux ont été supprimés. C'est le ligand de la structure PDB 1UWF qui a été utilisé comme ligand principal puisque c'est sur ce complexe qu'avait été basé l'arrimage moléculaire rigide avec MOE avant que FITTED ne soit disponible. Les six structures (5 récepteurs +1 ligand) ont été sauvegardées sous format .mol2¹⁰⁴ (au lieu de .pdb). En fait, FITTED utilise le format .mol2 modifié (par ProCESS) aux sections @<TRIPOS>ATOM et/ou @<TRIPOS>BOND (dépendamment du fichier de sortie).

Les noms de fichiers d'entrée de ProCESS sont inscrits dans le fichier « mot-clef » (*keyword*) 1uwf_flex.txt où tous les autres paramètres sont également inscrits. En fait, ce sont à peu près toutes les valeurs par défaut de ProCESS 2.5, excepté cinq valeurs. L'idée est de pouvoir ouvrir les fichiers de sortie de FITTED avec MOE, donc d'avoir la structure

¹⁰² RCSB Protein DataBank ©2010 <http://www.pdb.org/> [consulté le 2 avril 2010]

¹⁰³ MOE: Molecular Operating Environment ©2010 <http://www.chemcomp.com/software.htm> [consulté le 2 avril 2010]

¹⁰⁴ Tripos MOL2 File Format ©2009 <http://www.tripos.com/data/support/mol2.pdf> [consulté le 2 avril 2010]

complète de la protéine avec des atomes bien reconnus. C'est pourquoi la valeur de « cutoff » a été ajustée à 60 Å et « truncate » pour « no » ce qui englobe toute la protéine. La valeur de « AutoFind_Center » a également été changée pour « yes ».

La première étape de ProCESS est de définir le site d'interaction et de générer le fichier `luwf_prot_site.txt` qui contient, dans le cas du FimH, 27 résidus d'acides aminés: PheN1, Ala2, Ile13, Gly14, Gly15, HisE45, Asn46, Asp47, Tyr48, Pro49, Thr51, Ile52, Thr53, Asp54, Tyr55, Tyr95, Arg98, Gln133, Thr134, Asn135, Asn136, Tyr 137, Asn138, Asp140, Asp141, Phe142 et Phe144. La seconde étape consiste normalement à faire une troncation de la protéine dans le but de sauver du temps de calcul. Par contre, étant donné que « Truncate = no » et « cutoff = 60 », tous les acides aminés sont donc listés dans les 5 fichiers `xxxx_prot_dock.mol2` (xxxx = code PDB). Dans la troisième étape de ProCESS, est générée la cavité du site d'interaction, ce qui évite de calculer des conformations pour lesquelles le ligand se trouve hors du site d'interaction (ce qui permet encore une fois de sauver du temps de calcul). Un volume de dimension « Grid_Center ± Grid-Size » est créé et des sphères sont générées à une distance dépendante de la valeur « Grid_Resolution ». Les sphères à une distance « Grid_Clash » de la protéine ou au-delà d'une distance « Grid-Size » du centre du site d'interaction sont enlevées. Les coordonnées tridimensionnelles des 376 sphères représentant le site d'interaction sont sauvegardées dans le fichier `luwf_bindsite.mol2` (figure 28). Quatrièmement, sont générés les pharmacophores (donneurs ou accepteurs de pont H, interactions hydrophobes) dans le site d'interaction. Les paramètres par défaut ont été utilisés, ce qui a donné la génération de 66 pharmacophores : soit 13 donneurs de pont H, 29 accepteurs de ponts H et 24 interactions hydrophobes (figure 28). Ces pharmacophores sont retrouvés dans le fichier `luwf_IS.mol2`. Cinquièmement et dernière étape de ProCESS, est générée la surface de solvation et est évaluée sa contribution énergétique à la fonction RankScore de FITTED. Le tout est enregistré dans 5 fichiers de sortie, soit `xxxx_prot_score.mol2` (xxxx = code PDB). Un dernier fichier est généré par ProCESS, `luwf.out`, qui n'est aucunement utilisé par FITTED, dans lequel sont inscrites les erreurs ou la complétion avec succès du programme.

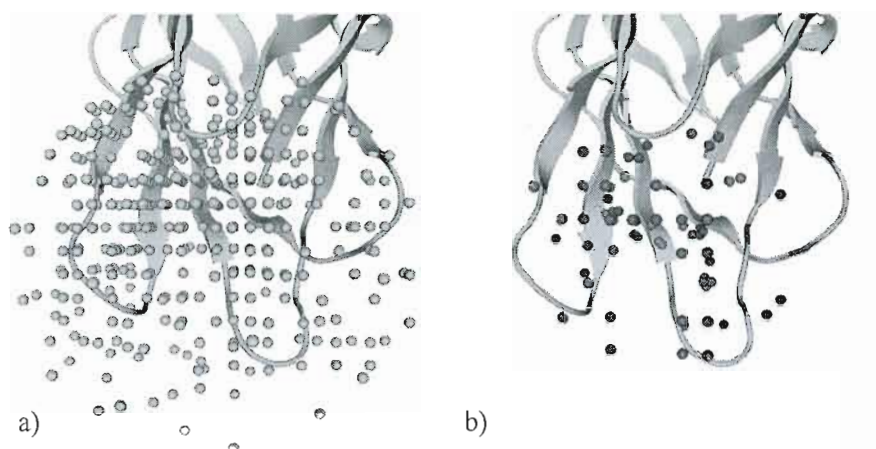


Figure 3.5 a) Génération de la cavité du site d'interaction par ProCESS b) Génération des Pharmacophores par ProCESS: les donneurs de ponts hydrogène sont représentés en rouge, les accepteurs en bleu et les hydrophobes en vert.

En tout, sont générés par ProCESS 14 fichiers de sortie, les 13 premiers (figure 30) sont utilisées directement par FITTED 2.5 comme fichiers d'entrée. Il ne manque que la conversion par SMART des fichiers des divers ligands à arrimer au FimH avant de passer au logiciel FITTED.

```

* Input and output files
*
*****

Protein

5
1kiu_prot.mol2
1klf_prot.mol2
1tr7_prot.mol2
1uwf_prot.mol2
2vco_prot.mol2
1uwf
1uwf_bindSite
1uwf_IS

# File that will contain the output structure
# File that will contain the grid
# File that will contain the pharmacophore

Output
Binding_Site_Cav
Interaction_Sites

*
* Binding Site
*****
AutoFind_Site
AutoFind_Center
Ligand
Ligand_Cutoff

yes [valeur par défaut]
yes [valeur modifiée]
1uwf_ligand.mol2
6 [valeur par défaut]

# Finding site automatically
# Finding center automatically
# Ligand used to find center and site
# Residues within cutoff are part of the binding site

*
* Actions
*****

Assign_G
Truncate

yes [valeur par défaut]
no [valeur modifiée]

# Assigning residue names
# Truncates the protein keeping the residues within the
# cutoff distance

Cutoff
United

60 [valeur modifiée]
no [valeur modifiée]

# Cutoff distance
# Makes the united atom representation

```

```

*
* Interaction sites description
*****

Pharm_Polar_Softness      0.0 [valeur par défaut]
Pharm_NonPolar_Softness  0.0 [valeur par défaut]
Pharm_Aromatic_Softness  0.0 [valeur par défaut]
Aromatic_weight          1 [valeur par défaut]
Metal_weight             50 [valeur par défaut]
Hydrophobic_weight       1 [valeur par défaut]
HBA_weight               5 [valeur par défaut]
HBD_weight               5 [valeur par défaut]
Hydrophobic_Level       -0.3 [valeur par défaut]
Hydrophobic_Resolution   2 [valeur par défaut]
Min_weight               0.5 [valeur par défaut]
Num_of_IS                75 [valeur par défaut]

# max distance between two polar points to merge
# max distance between two non polar points to merge
# max distance between two aromatic points to merge
# weight given to aromatic points
# weight given to metal points
# weight given to hydrophobic points
# weight given to HBA points
# weight given to HBD points
# vdW interaction with hydrophobic carbons
# grid resolution for computation of hydrophobic points
# Minimum weight to be included in the pharmacophore
# Maximum number of beads

*
* Active site cavity description
*****

Pharmacophore
Grid_Boundary
Grid_Resolution
Grid_Size
Grid_Clash

pharm [valeur par défaut]
soft [valeur par défaut]
1.5 [valeur par défaut]
12.5 [valeur par défaut]
1.5 [valeur par défaut]

# File that will contain the pharmacophore
# Grid computed within a box (hard) or not (soft)
# Grid resolution
# Grid size
# Max dist to consider a point clashing with the protein

```

Figure 3.6 Les différents paramètres du fichier `luwf_flex.txt` pour ProCESS 2.5.

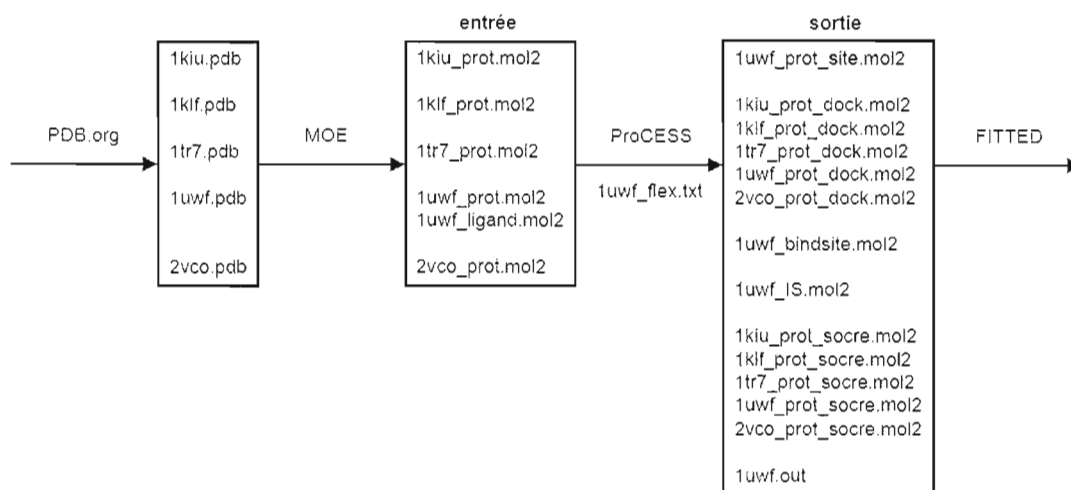


Figure 3.7 Les fichiers d'entrée et de sortie de ProCESS 2.5.

2.3.2 Utilisation de SMART

Dans un premier temps, 81 mannopyrannosides ont été préparés avec SMART pour être utilisés dans la construction du modèle QSAR. Par la suite, d'autres mannopyrannosides (dont ceux synthétisés au laboratoire) ont subi le même traitement et leur K_d a été évalué à l'aide du modèle QSAR. Pour tous ces ligands, ils ont d'abord été construits dans MOE, minimisés à l'aide des champs de force appropriés et sauvegardés sous format .mol2.

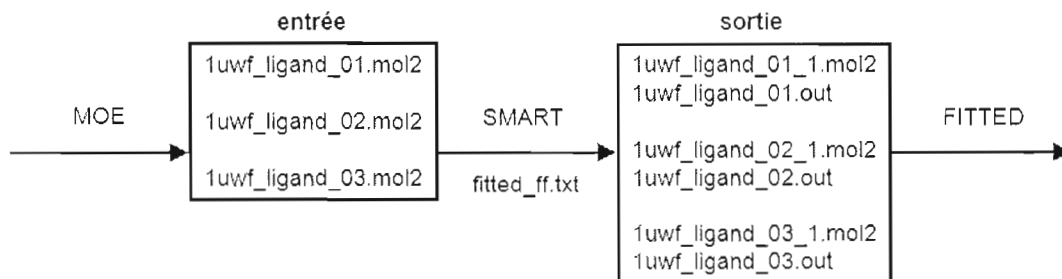


Figure 3.8 Les fichiers d'entrée et de sortie de SMART 2.5.

Les étapes du traitement de SMART consistent à définir les liens rotatifs, assigner les types d'atomes selon GAFF et MMFF, calculer les charges partielles, la charge totale et identifier les groupes fonctionnels présents dans la molécule.

2.3.3 Utilisation de FITTED

Pour un problème complexe donné, l'utilisation d'un algorithme génétique simplifie les données en ensembles d'éléments appelés chromosomes. Dans le cas des interactions entre un récepteur et une molécule organique, chaque chromosome représente un complexe protéine-ligand. Les chromosomes contiennent différentes variables (les gènes), dont les valeurs d'angles de torsion, de torsion de cycles, de translation, d'orientation, de chaîne principale de la protéine, des molécules d'eau et de résidus d'acides aminés du site d'interaction dans le cas d'un arrimage moléculaire flexible tenant compte des molécules d'eau.

La première étape consiste à créer de la population initiale pour laquelle des valeurs de torsion, d'orientation et de position sont générées aléatoirement. Sans entrer dans les détails, une population initiale de bonne qualité est générée après avoir passé notamment les filtres des fonctions PharmScore, MatchScore, ClashScore, GAFScore intégrées dans FITTED. Voir le guide d'utilisateur de FITTED pour plus de détails.¹⁰¹

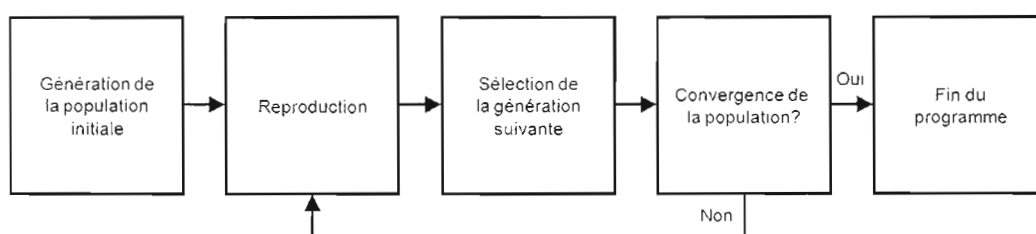


Figure 3.9 Les étapes de l'algorithme génétique de FITTED 2.5
(Tiré directement du manuel d'utilisateur).¹⁰¹

La seconde étape est appelée reproduction (ou évolution) et permet de générer des chromosomes enfants à partir de chromosomes parents. L'information est échangée au hasard entre deux chromosomes parents pour donner deux chromosomes enfants. En plus du croisement d'information, il y a aussi une probabilité de mutation qui empêche de converger vers un minimum local d'énergie.

Troisièmement, une fois les chromosomes parents et enfants générés, il s'en suit la sélection (tout comme la sélection naturelle) de la prochaine génération. Avec les paramètres par défaut de FITTED (Steady_State), les deux meilleurs chromosomes sont choisis parmi les 4 (2 parents + 2 enfants) pour faire partie de la génération suivante. Le but de cette évolution est d'arriver à une convergence énergétique (globale et non locale) et de trouver le meilleur individu, soit la solution au problème complexe initial. Ainsi, entre chaque génération, les chromosomes doivent *apprendre* quels sont les meilleures valeurs de torsion, orientation, position et de les transmettre à leurs enfants. C'est ainsi que fonctionne un algorithme génétique de type Lamarckien.

Quatrièmement, lorsque la génération « n » est arrivée à terme, cette dernière est évaluée selon des critères pour savoir s'il y a convergence ou non: les plus importants sont Max_Gen et Best - Average. C'est-à-dire, lorsque l'énergie d'un chromosome se trouve en-dessous de l'énergie moyenne de sa génération d'une valeur de 1,0 kcal/mol, la convergence est considérée comme atteinte. Si ce dernier critère n'est pas respecté après 200 générations, la convergence est atteinte puisque qu'il n'y a pas de 201^e génération (valeur par défaut).

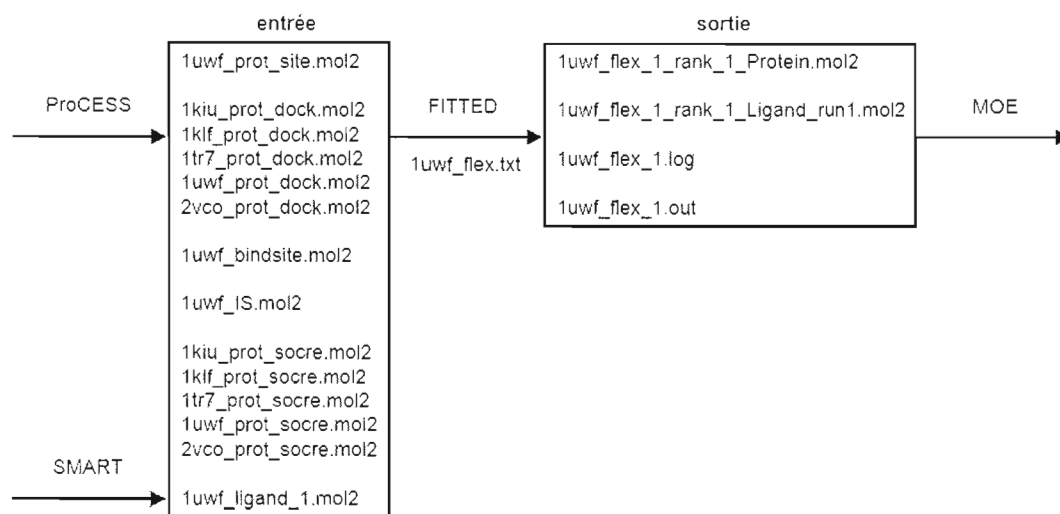


Figure 3.10 Les fichiers d'entrée et de sortie de FITTED 2.5.

Les paramètres par défaut de FITTED ont été utilisés dans le fichier 1uwf_flex.txt, excepté pour le nombre de complexes à sauvegarder sous format .mol2.

```

#INPUT/OUTPUT FILES
#####

Protein      5      # Number of protein files
              1kiu_prot
              1klf_prot
              1tr7_prot
              1uwf_prot
              2vco_prot
              1uwf_ligand_01_1.mol2
              1uwf_flex
              fitted_ff.txt
              Auto [valeur par défaut]*

Ligand
Output
Forcefield
Parameters
Ref 1
              1uwf_ligand_01_1.mol2
              1uwf_bindSite.mol2
              1uwf_IS.mol2
              20 [valeur par défaut]*

Binding_Site_Cav
Interaction_Sites
Min_MatchScore

# Evolution
#-----
GA_Max_Iter      20 [valeur par défaut]      # Maximum Number of Iterations

#
#GENETIC ALGORITHM PARAMETERS
#####
#
# Creation of the initial population
#-----

```

```
Mode Dock [valeur par défaut]
Flex_Type Flex [valeur par défaut]
Pop_Size 150 [valeur par défaut]*

Max_Tx 5 [valeur par défaut]
Max_Ty 5 [valeur par défaut]
Max_Tz 5 [valeur par défaut]

#
# Evolution
#-----
Max_Gen 200 [valeur par défaut]

#
# Convergence and output
#-----

Print_Level 1 [valeur par défaut]
Print_Structures Final [valeur par défaut]
Print_Best_Every_X_Gen 5 [valeur par défaut]*
Print_Num_Structures 1 [valeur modifiée]
Print_Energy_Full no [valeur par défaut]*
Diff_Avg_Best 1.0 [valeur par défaut]
Diff_N_Best 0.4 [valeur par défaut]
Diff_Number 20 [valeur par défaut]*
Number_of_Best 1 [valeur par défaut]*

#
#
#
#####
# Standard deviation criterion
#
# Number of best structures to be ouput
#
#
#
#####
```

Figure 3.11 Les différents paramètres du fichier luwf_flex.txt pour FITTED 2.5.
* Paramètres par défaut donnés dans le guide d'utilisateur de FITTED 2.6.¹⁰¹

Les fichiers de type « luwf_flex_1_rank_1_Ligand_run1.mol2 », qui sont en fait les fichiers de sortie de FITTED représentant les ligands, peuvent être ouverts directement avec MOE. Toutefois, avec les fichiers de type « luwf_flex_1_rank_1_Protein.mol2 », il faut modifier la colonne « type d'atome » du format de fichier.mol2 modifié, sans quoi la structure de la protéine est formée d'atomes de calcium (Ca), sodium (Na), holmium (Ho), hahnium (Ha), etc. En fait, cela est dû au fait que FITTED convertit le nom des atomes du récepteur où Ca et Ha, par exemple, représentent une carbone et un hydrogène aromatique. Pour retrouver les noms d'atomes originaux, il suffit d'ouvrir le fichier .mol2 du récepteur à l'aide de Microsoft Office Word 2007 et de taper Ctrl+H pour remplacer tous les noms d'atomes modifiés ou bien de se créer une macro pour le faire plus rapidement. De cette manière, les atomes ha, hc, ho, hn et hw sont convertis en h, ss en s et ainsi de suite (voir tableau 10). Seuls les fichiers des ligands sont ensuite utilisés avec MOE pour le modèle QSAR, la reconversion des noms d'atomes des fichiers du récepteur n'a d'utilité que pour bien représenter les complexes protéines-ligands minimisés à l'écran, pour en faire des images par exemple.

h	c	n	o	s
ha				
hc	ca	na	oh	ss
ho	cau	n3	ow	
hn	c3	n4		
hw				

Tableau 3.4 Conversion des noms des atomes de FITTED vers MOE.

Tous les calculs de FORECASTER 2.5 (ProCESS 2.5, SMART 2.5 et FITTED 2.5) ont été effectués sur le même ordinateur Aspire 5560Z d'Acer possédant un processeur double-cœur T2060 Pentium® d'Intel® à 1,6- GHz ainsi que 1 Go de mémoire vive DDR2 sous le système d'exploitation Windows Vista™ Home Premium.

3.3 UTILISATION DE MOE

Molecular Operating System ou MOE est un logiciel de modélisation moléculaire utilisé pour diverses tâches telles que la recherche de pharmacophores, l'étude de conformères, l'arrimage moléculaire (*docking*), le calcul de descripteurs moléculaires, la construction de modèle mathématiques (QSAR/QSPR), la minimisation de l'énergie, la dynamique moléculaire, etc. Avec MOE, l'outil de minimisation d'énergie n'est pas très développé (le logiciel est en développement constant) et n'est pas aussi complet qu'avec FITTED. Par contre, différents outils sont disponibles avec MOE pour l'élaboration de modèles QSAR, notamment QuaSAR-Model (intégré à MOE), AutoQuaSAR - RSI 2005.10.01 et QuaSAR-Evolution - RSI 2004.10.01 (deux scripts SVL intégrables à MOE).

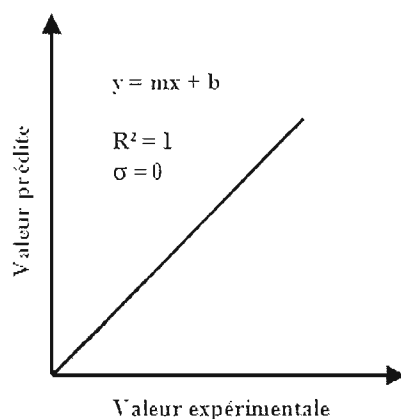


Figure 3.12 Graphique d'un modèle QSAR idéal.

La chimie thérapeutique est basée sur la relation entre la structure d'une molécule et son activité biologique (*Structure-Activity Relationship* ou SAR). Selon ce principe, il est possible de prévoir des propriétés physiques ou des activités biologiques à partir de la structure moléculaire. L'idée du SAR a émergée en 1868, lorsque Crum-Brown et Fraser ont affirmé que les effets physiologiques de substances chimiques dépendent directement de leur structure.¹⁰⁵ Le premier QSPR a été construit en 1947 dans le but de prédire la température

¹⁰⁵ Crum-Brown, A., and Fraser, T. R., *Trans. Roy. Soc. of Edinburgh*, **1868**, 25, 151-203

avec seulement trois variables dans le modèle.¹⁰⁶ Plus tard, le premier QSAR, élaboré en 1962, consistait à corréler la capacité de molécules organiques à réguler la croissance de plantes *versus* leurs effets stériques et leur hydrophobicité.¹⁰⁷ Aujourd'hui, simplement à partir de chaînes de caractère SMILES il est possible de reconstruire la structure moléculaire, construire un modèle mathématique et prévoir la valeur d'une propriété physique (QSPR) ou d'une activité biologique (QSAR).

Pour construire un modèle QSAR, il faut deux groupes de données: soit un ensemble d'entraînement (*training set*) et un ensemble d'évaluation (*test set*). Le premier ensemble est en quelque sorte l'équivalent des solutions standard en chimie analytique; le second les solutions inconnues. C'est à partir des solutions standard qu'est construite la droite d'étalonnage qui va elle-même servir à déterminer la concentration des inconnus. Le même principe est appliqué avec la modèle QSAR: à partir de l'ensemble d'entraînement est construit un graphique qui va servir à évaluer la propriété désirée.

La difficulté dans la construction du modèle QSAR est le problème du choix de variables. Dans un monde idéal, un modèle QSAR serait fonction d'une seule variable, ce qui n'est pas du tout le cas pour des problèmes complexes réels. Avec des logiciels de modélisation moléculaire comme MOE, il est possible de calculer des centaines de variables, appelées descripteurs moléculaires. Mais comment choisir les variables pour le modèle? Diverses solutions peuvent répondre à cette question, dans ce cas-ci a été utilisé un algorithme génétique se basant sur la méthode de moindres carrés partiels (PLS).

Selon le principe du QSAR, un petit changement dans la structure d'un composé entraîne une petite variation dans son activité biologique; alors qu'un grand changement de structure entraîne une grande variation d'activité. Toutefois, dans les cas réels, il arrive souvent qu'un petit changement de la structure molécule entraîne une grande variation de la propriété étudiée: c'est le paradoxe du QSAR.

¹⁰⁶ Wiener, H., *JACS*, **1947**, 69, 17- (1947)

¹⁰⁷ Hansch, C., Maloney, P. P., and Fujita, T., *Nature*, **1962**, 194, 178-180

Avec une petite centaine de descripteurs moléculaires, il est possible d'arriver à un modèle mathématique dont le coefficient de détermination (R^2) approche 1 et l'écart-type (σ) est non loin de 0. Cette précision extrême comporte deux défauts majeurs. Premièrement, un modèle mathématique qui comporte quelques centaines de variables devient très complexe, dont de longs temps de calculs et une difficulté augmentée de rationaliser (interpréter) le modèle. Deuxièmement, une précision quasi-parfaite n'est pas nécessairement gage de l'exactitude des prédictions. C'est pourquoi il faut réduire le nombre de variable à une valeur acceptable et, par conséquent, diminuer le R^2 en-deçà de 1 (donc augmenter l'écart-type).

Quant aux descripteurs moléculaires, ils sont généralement classés en trois catégories: unidimensionnels (1D), bidimensionnels (2D) et tridimensionnels (3D).¹⁰⁸ Les descripteurs moléculaires unidimensionnels sont uniquement basés sur la formule moléculaire; seule la présence d'atome est requise comme information comme par exemple la masse molaire, le nombre d'atomes de carbone, le nombre d'atomes d'oxygène, etc. Pour les descripteurs 2D, la connectivité interatomique doit être connue et c'est pourquoi ils sont basés sur la structure moléculaire. Dans cette catégorie se trouvent par exemple le nombre de cycles, le nombre d'accepteurs de ponts H, le coefficient de partage, etc. La conformation spatiale des atomes d'une molécule est essentielle à l'évaluation d'un descripteur 3D. Dans cette classe se trouvent, par exemple, tous les descripteurs de surfaces, de charges partielles, le moment dipolaire, etc. En somme, les descripteurs moléculaires 1D ont les mêmes valeurs pour deux isomères; les 2D ont les mêmes valeurs pour deux stéréoisomères.

¹⁰⁸ Hong, H., Xie, Q., Ge, W., Qian, F., Fang, H., Shi, L., Su, Z., Perkins, R., and Tong W., *J. Chem. Inf. Model.*, **2008**, 48, 1337-1344

2.3.1 Recherche de descripteurs moléculaires

Avec les 81 mannopyrannosides dockés avec FITTED 2.5, l'ensemble d'entraînement, ont été calculés pour chacun les 622 descripteurs moléculaires disponibles dans MOE 2007.09. C'est-à-dire les 327 descripteurs moléculaires par défaut plus les 172 MACCS, 50 descripteurs inductifs, 30 DLI (*drug-like index*), 22 pour la charge du champ de force, 6 pour la description du champ de force, 6 Sterimol, 3 pour les surfaces, 2 CHI2, 2 PSA, 1 Andrews et 1 pour les liens rotatifs. Les descripteurs moléculaires ajoutés ont été téléchargés sous forme de scripts SVL (en format de fichier .svl) sur le site web de CCG *via* le forum des utilisateurs « *SVL Exchange* ».¹⁰⁹

Tel que mentionné plus haut, avec le logiciel MOE, trois outils servent à choisir les descripteurs moléculaires: QuaSAR-Model, AutoQuaSAR et QuaSAR-Evolution. C'est ce dernier qui a été utilisé étant donné sa plus grande complexité (il peut tenir compte jusqu'à 14 opérateurs mathématiques différents) et peut générer un très grand nombre de modèles dans un temps de calcul raisonnable. Par défaut, l'algorithme génétique de QuaSAR-Evolution crée une population initiale de 100 équations (qui possèdent 4 descripteurs moléculaires) et évolue sur 500 générations pour ne conserver que les 100 meilleures équations évaluées d'après le test de manque d'adéquation (*Friedman's Lack of Fit* ou LOF).

¹⁰⁹ SVL Exchange ©2004 <http://svl.chemcomp.com/> <http://www.fitted.ca> [Consulté le 2 avril 2010]

Qua\$AR Evolution - RSI 2004.10.01

Training Set: o/81 man - 622 dm - flexible and wet.mdb **Browse...** Selected Entries Only

Test Set: None **Browse...** Unselected Entries in Training Set

Method: Fixed Length GA **Model Evaluation:** R2

Activity Field: -log Kd exp (M) **Weight Field:** None

☐ Eliminate Recessive Gene after Evolution ☐ View Equations ☐ View Trajectory

Descriptors:

andrews	weinerPol	BCUT_SLOCP_3
diameter	BCUT_PEOE_0	BCUT_SMR_0
petitjean	BCUT_PEOE_1	BCUT_SMR_1
petitjeanSC	BCUT_PEOE_2	BCUT_SMR_2
radius	BCUT_PEOE_3	BCUT_SMR_3
VDistEq	BCUT_SLOCP_0	GCUT_PEOE_0
VDistMa	BCUT_SLOCP_1	GCUT_PEOE_1
weinerPath	BCUT_SLOCP_2	GCUT_PEOE_2

Essential Desc.: **Set** **Remove**

Operant:

inv	invsqr	invsqrt	invcube	invcbirt	invlog10	invlo
sqr	sqrt	cube	cbirt	log10	log	exp

Initial Length: 14 **Population:** 100 **Operant Density:** 4 **Generation:** 50000

Mutation Probability: 0.5 **Eugenic Factor:** 100 **Auto Termination:** 1000

Cross Validation: **Validate** by Leave One Out **Method for the Best** **Equation(s)**

Activity Calculation: **Calculate** Activity by No. 1 equation for man - 622 dm - flexible and wet.mdb

Export Model: **Export** No. 1 **Model into** el for qsar (no truncate) + 2h2o/mymodels.mdb
as 81 man - 622 dm - flexible and wet

RUN **Cancel**

Figure 3.13 Fenêtre de lancement de l'algorithme génétique Qua\$AR-Evolution - RSI 2004.10.01 utilisé avec le logiciel MOE pour déterminer l'équation du modèle QSAR.

Les paramètres appliqués dans le présent travail sont un algorithme génétique de taille fixe (par défaut) avec l'évaluation du modèle basé sur le coefficient de détermination (R^2). Le champ d'activité choisi est « -log Kd exp (nM) », puisque « Kd exp (nM) » converge trop rapidement vers une valeur de R^2 acceptable et donne une distribution de l'ensemble d'entraînement où la majorité des points se retrouvent au bas du graphique (donc R^2 très biaisé). Avec « -log Kd exp (nM) », la distribution des points sur le graphique est beaucoup plus uniforme, donc un R^2 plus fiable. Comme taille initiale, la valeur 14 a été déterminée par essai-erreur en se basant sur la valeur du R^2 obtenu. Tel que mentionné en introduction, la valeur du coefficient de détermination dépend directement du nombre de descripteurs choisis

pour le modèle QSAR. Il suffit donc de trouver un équilibre acceptable entre une bonne corrélation et un petit nombre de descripteurs moléculaires. Le critère pour le coefficient de détermination a été établi à 0,85, valeur à laquelle une distribution statistique est considérée comme ayant une forte corrélation entre les deux variables (prédite et expérimentale).

Comme opérateurs mathématiques, les 14 disponibles ont été sélectionnés: inverse, carré, inverse du carré, racine carrée, inverse de la racine carrée, cube, inverse du cube, racine cubique, inverse de la racine cubique, log, inverse du log, ln, inverse de ln et exponentielle. La taille initiale (et finale puisque la taille est laissée fixe) est de 14. Tous les autres paramètres sont laissés par défaut: pas de champ ayant plus de poids (*weigh field*), pas de descripteurs moléculaires essentiels, population de 100 individus, 500 générations (donc environ 50 000 équations générées au total), etc.

L'équation du modèle final possède 14 descripteurs moléculaires différents (obtenus après 1000 générations), dont 3 sur lesquels a été appliqué un opérateur mathématique. La plupart de ces descripteurs représentent la polarité du ligand. Dans l'équation suivante, les coefficients ont été arrondis au dixième près sinon à un chiffre significatif près pour plus de clarté.

$$-\log K_d \text{ prédit} = 0,7A + 0,1B - 1,3C + 1,7D + 0,06E + 0,4\sqrt{F} - \frac{2,6}{\ln G} + 0,3 H - \frac{1,8}{\log_{10} I} + 0,0004 J + 1,5 K + 4,4 L - 0,2 M - 0,0002 N - 6,4$$

A = DLI(24)	La taille maximale des plus petits cycles ¹¹⁰
B = DLI(25)	La taille maximale d'une fonction terminale ¹¹⁰
C = MACCS(-79)	Nombre d'atomes d'azote séparés par 3 liens
D = Most_Pos_Rs_i_mol	Atome le plus positif dans la molécule
E = PEOE_VSA+1	Surface de Van der Waals positive (+1) totale
F = PEOE_VSA-2	Surface de Van der Waals négative (-2) totale
G = PEOE_VSA_FPOL	Surface de Van der Waals polaire fractionnée

¹¹⁰ Xu, J., and Stevenson, J., *J. Chem. Inf. Comp. Sci.*, **2000**, 40, 1177-1187

I = dock_HB	Force des ponts H
J = pmiX	Principal moment d'inertie sur l'axe des x
K = std_dim3	Dimension standard 3
L = vsurf_IW1	Moment dipolaire hydrophile à -0,2
M = vsurf_Wp6	Volume polaire à -4
N = weinerPath	Polarité selon Wiener en termes de forces
intramoléculaires ¹⁰⁶	

Figure 3.14 Équation simplifiée du modèle QSAR et détail des variables (descripteurs moléculaires) utilisées.

Le modèle ainsi obtenu est relativement simple avec *seulement* 14 variables (il aurait été beaucoup plus complexe avec 622 ou 150 variables). Le coefficient de détermination montre une forte corrélation linéaire ($R^2 = 0,8557$), ce qui permet d'établir une tendance. Par contre, la valeur de l'écart-type est assez élevée ($\sigma = 0,4270$), ce qui apporte une grande erreur sur les valeurs de K_d prédites. Toutefois, le but n'est pas de prédire l'activité biologique avec une haute précision, mais de voir encore la tendance générale et essayer de déterminer quels sont les descripteurs moléculaires essentiels.

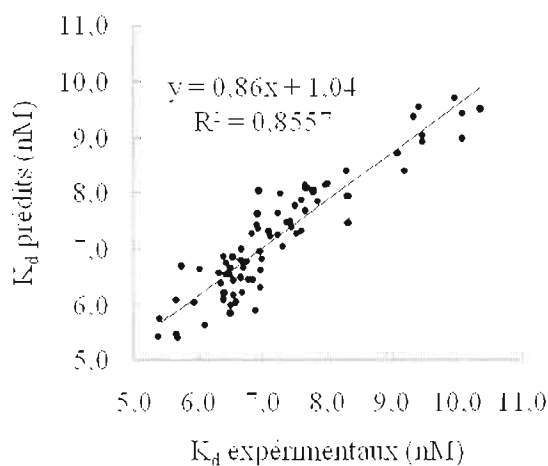
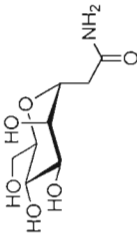
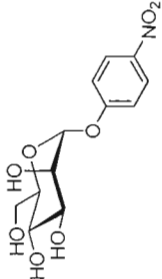
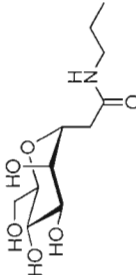
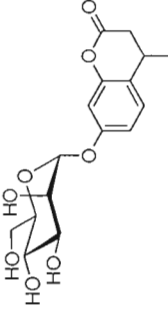
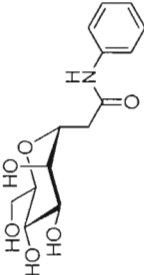
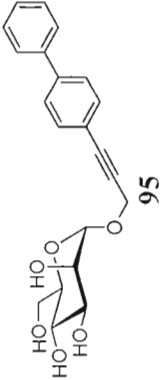
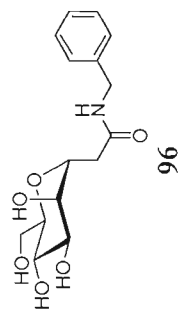


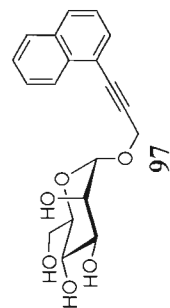
Figure 3.15 Graphique représentant les données de l'ensemble d'entraînement du modèle QSAR.

Molécule	K _d (nM)		Molécule	K _d (nM)	
	expérimental	prédit		expérimental	prédit
 90	4030	1760	 91	44	31
 92	109	238	 93	20	7,7
 94	372	278	 95	459	395



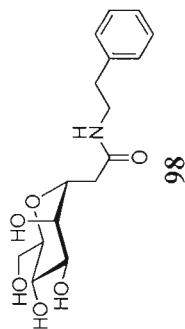
379

172



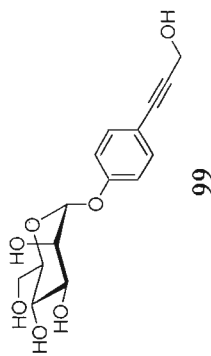
120

41



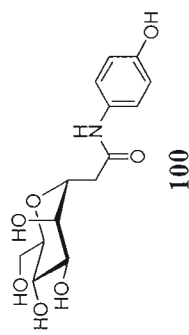
109

472



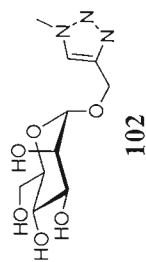
0,65

3,8



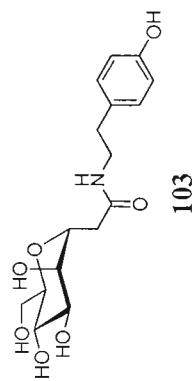
328

1382



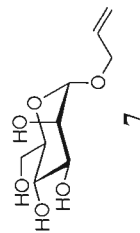
204

168



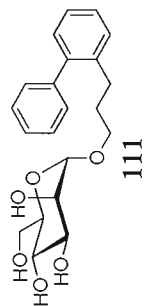
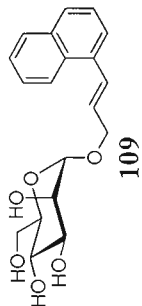
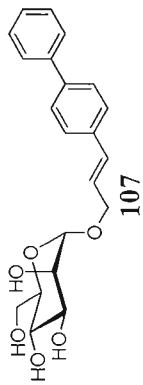
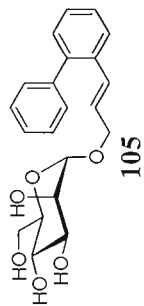
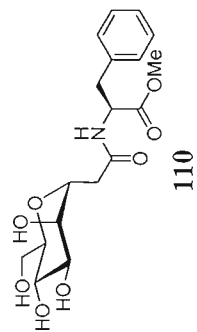
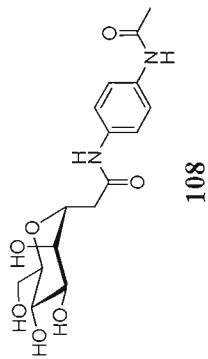
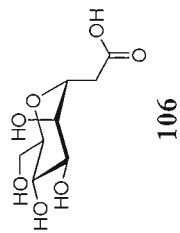
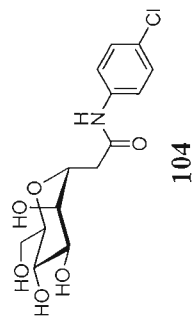
970

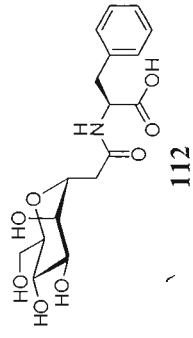
221



0,085

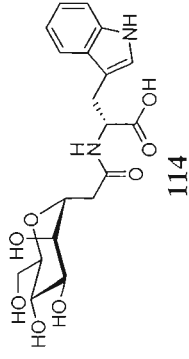
1,0





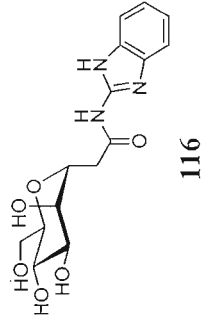
0,36

0,88



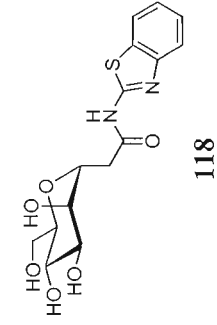
0,045

0,29



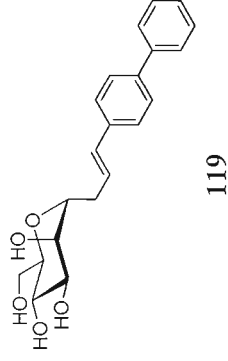
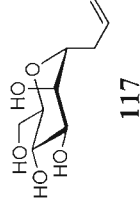
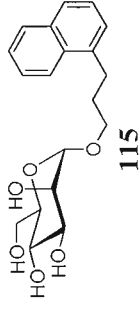
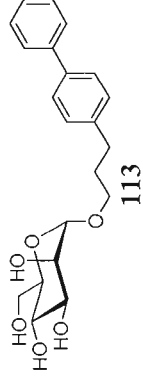
118

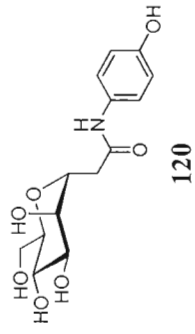
8,7



17

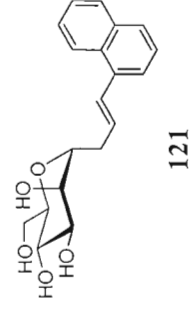
9,2





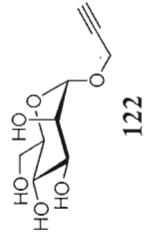
328

214



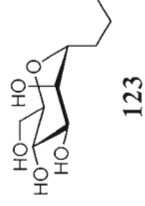
0,84

1,9



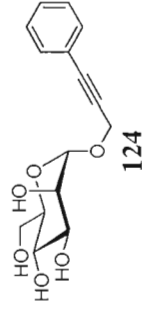
490

264



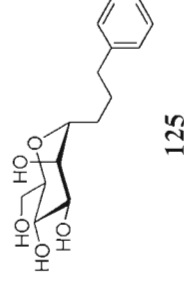
266

862



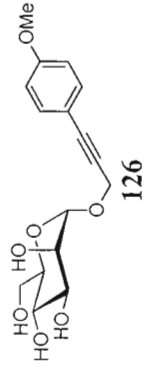
168

342



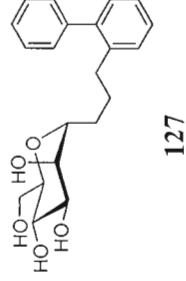
49

85



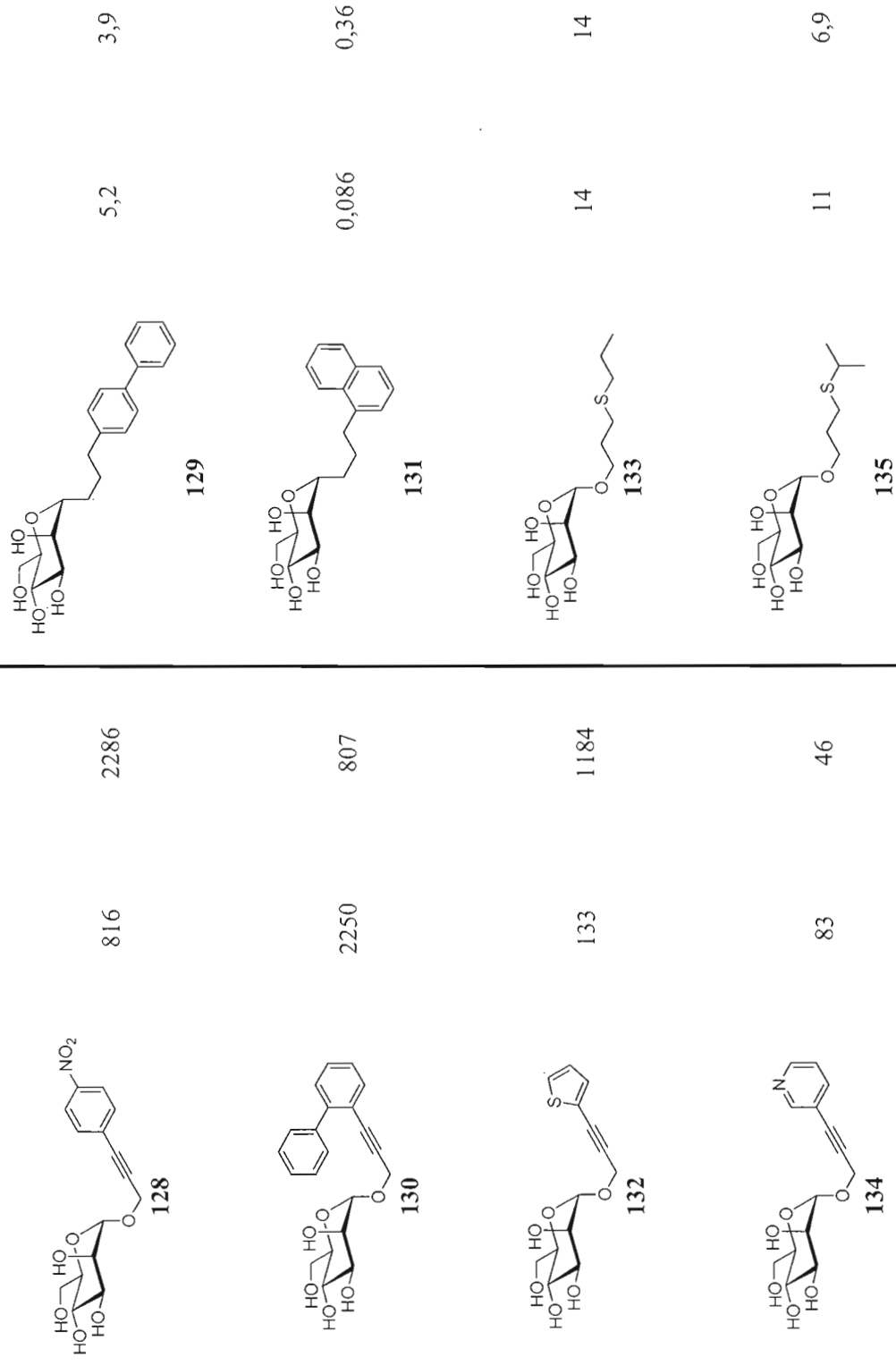
293

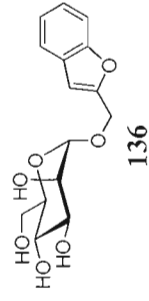
349



123

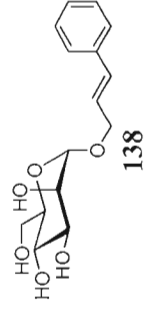
23





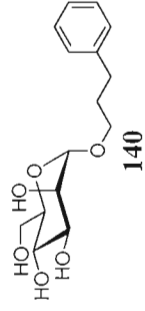
104

145



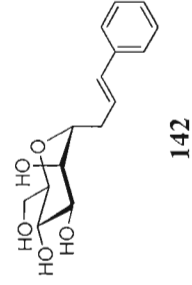
53

10



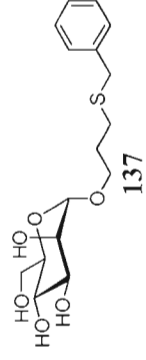
59

22



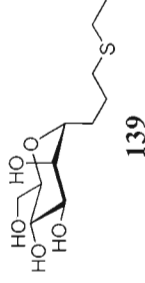
182

160



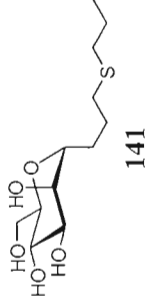
16

8,4



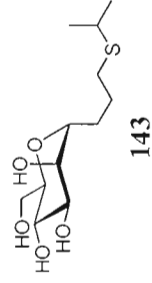
78

57



36

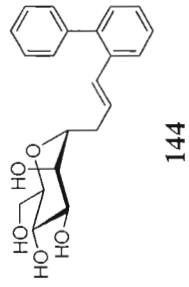
38



32

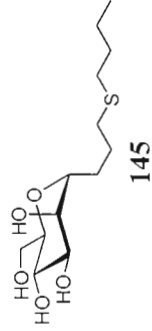
16

142



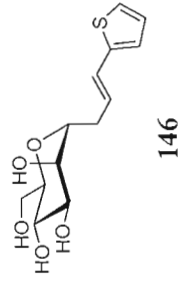
4,6

11



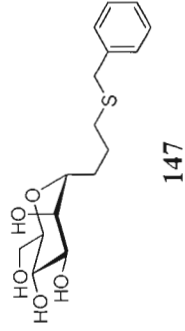
22

7,0



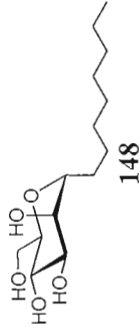
127

35



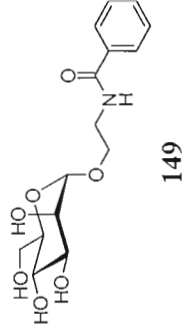
25

13



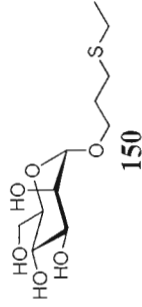
31

52



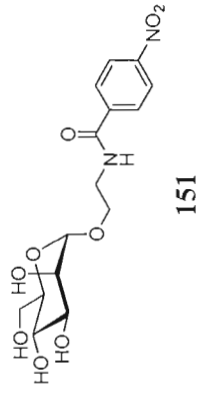
213

586



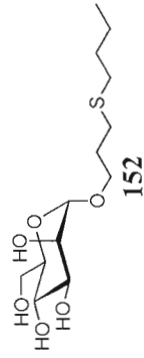
4,8

32



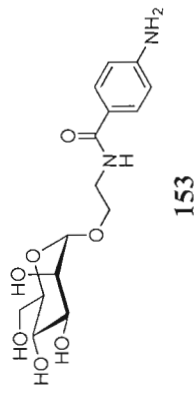
219

97



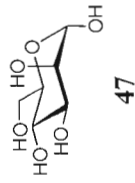
22

8,0



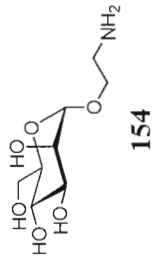
320

993



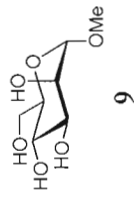
2300

3236



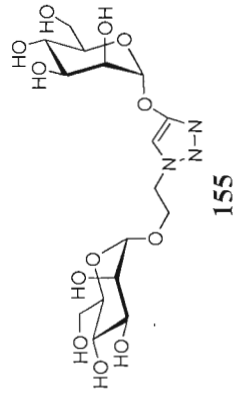
223

304



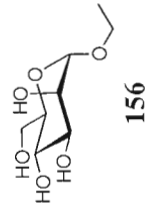
2200

3802



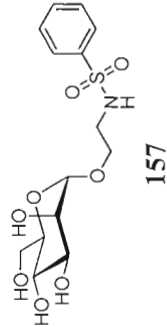
224

317



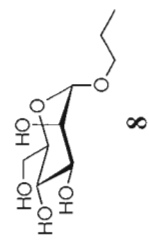
1200

873



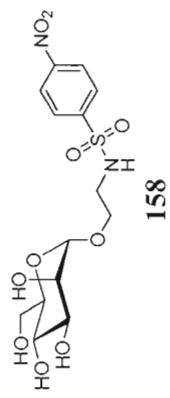
146

342



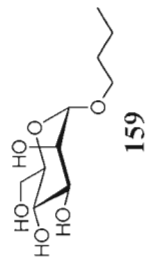
300

134



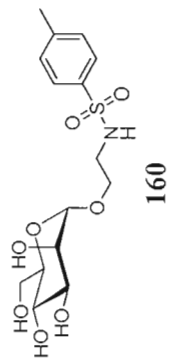
408

591



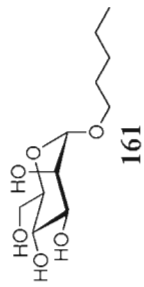
151

51



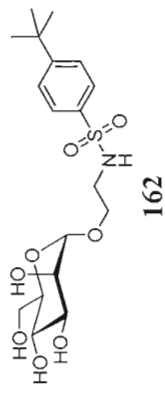
377

280



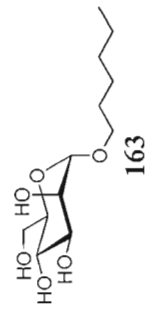
25

46



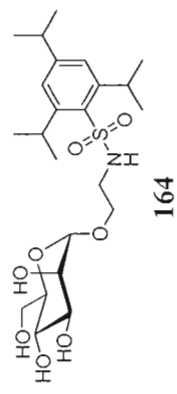
419

768



10

6,4



37

30

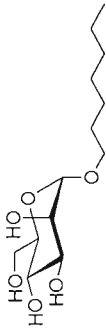
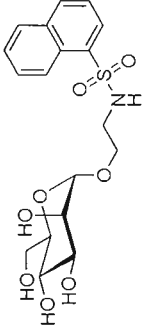
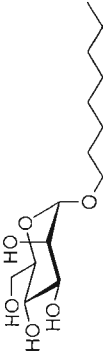
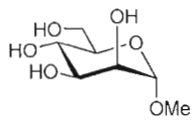
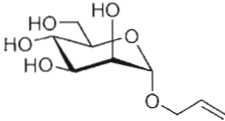
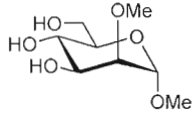
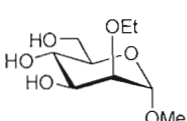
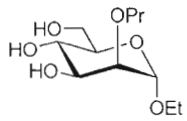
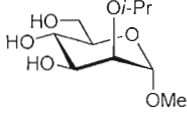
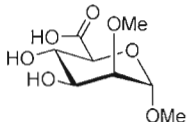
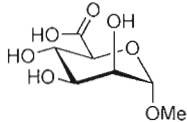
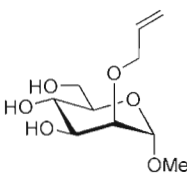
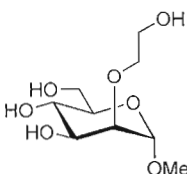
 <p>165</p>	5	11	 <p>166</p>	413	131
 <p>167</p>	22	20			

Tableau 3.5 Activités biologiques (K_d) expérimentales et prédites pour les 81 mannopyranosides synthétisés (70 par Mohamed Touaibia au sein du laboratoire Roy et 11 par Julie Bouckaert et son équipe⁵¹) et testés sur lequel le modèle QSAR est basé.

2.3.2 Prédiction de valeurs de K_d

Pour toutes les molécules synthétisées, ont été calculées à l'aide du modèle QSAR les valeurs prédites de la constante de dissociation.

Molécule	K_d prédit (nM)	Molécule	K_d prédit (nM)
 9	2200 (valeur testée)	 7	0,085 (valeur testée)
 33	720 (↓)	 34	554 (↓)
 35	184 (↓)	 36	4,6 (↓)
 37	35 (↓)	 168 ^a	3646 (↑) (testée sans activité biologique)
 169 ^b	0,012 (↓)	 40	0,000096 (↓)

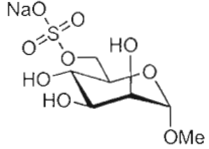
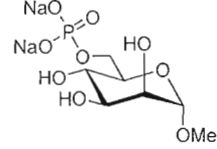
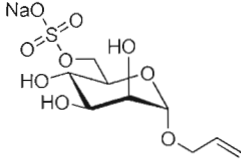
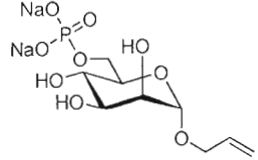
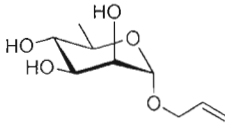
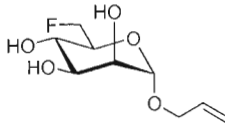
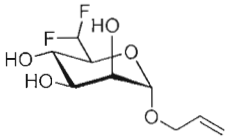
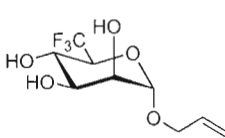
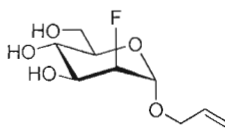
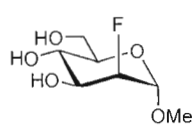
 63	380 (↓)	 66	1291 (↓)
 74	0,12 (↑)	 79^b	0,038 (↓)
 81	690 (↑)	 85	24 (↑)
 87^b	10 (↑)	 89^b	71 (↑)
 51	9 (↑)	 170^b	29 818 (↑)

Tableau 3.6 Activités biologiques (K_d) prédites (ou testées) pour les 12 mannopyranosides synthétisés: Les flèches (↑) ou (↓) indiquent si la valeur de K_d est augmentée ou diminuée par rapport à la référence (MeMan ou ManOAll).^a Molécule synthétisée par Milan Bergeron-Brlek. ^b Molécule non-synthétisée.

En ce qui concerne les modifications en C-2, les dérivés 2-*O*-alkyles saturés possèdent une valeur de K_d prédite plus basse que la référence (MeMan), soit entre 4,6 nM et 720 nM. Le dérivé 2-*O*-allyle serait un excellent inhibiteur avec un K_d de 0,012 nM; mais le composé éthylhydroxyle serait encore meilleur avec un K_d en-dessous de 0,0001 nM. Le composé 2-fluoré n'aurait pas d'activité biologique.

Par rapport aux modifications apportées en C-6, tout d'abord le composé **37** serait environ 65 fois meilleur inhibiteur que la référence. Par contre, cela ne corrèle pas avec le résultat des tests biologiques (le composé **168** n'a pas d'activité biologique) ni avec l'arrimage moléculaire. Parmi toutes les modifications en C-6, seul le phosphate posséderait une activité biologique accrue par rapport à la référence. Pour ce qui est des dérivés désoxy, le composé difluoré posséderait la meilleure activité biologique des 4, soit une diminution de l'activité d'environ 120 fois par rapport à ManOAll.

Un modèle QSAR sert à prédire l'activité des molécules similaires: les molécules de l'ensemble d'évaluation doivent être similaires aux molécules de l'ensemble d'entraînement. De ce fait, la prédiction d' α -D-mannopyrannosides modifiés aux positions 2- et/ou 6- (*test set*) apporterait un large biais par rapport aux α -D-mannopyrannosides modifiés à la position anomérique (*training set*).

L'étape suivante serait de tester biologiquement les molécules synthétisées, de comparer les valeurs de K_d prédites et expérimentales, puis d'ajuster le modèle QSAR pour qu'il tienne maintenant compte de ces valeurs. En ajoutant, des mannopyrannosides modifiés aux positions 2- ou 6- dans l'ensemble d'entraînement, il sera possible à l'avenir de prédire avec justesse les valeurs de K_d pour des mannopyrannosides modifiés aux positions 1-, 2- ou 6-.

2.3.3 Arrimage moléculaire sur le FimH

Après prédiction des valeurs de K_d et/ou résultat des tests biologiques, il est intéressant de pouvoir expliquer pourquoi telle molécule possède une aussi bonne ou aussi mauvaise affinité avec le FimH. Pour ce faire, l'arrimage moléculaire est l'outil adéquat pour présenter le détail des interactions entre la protéine et le ligand.

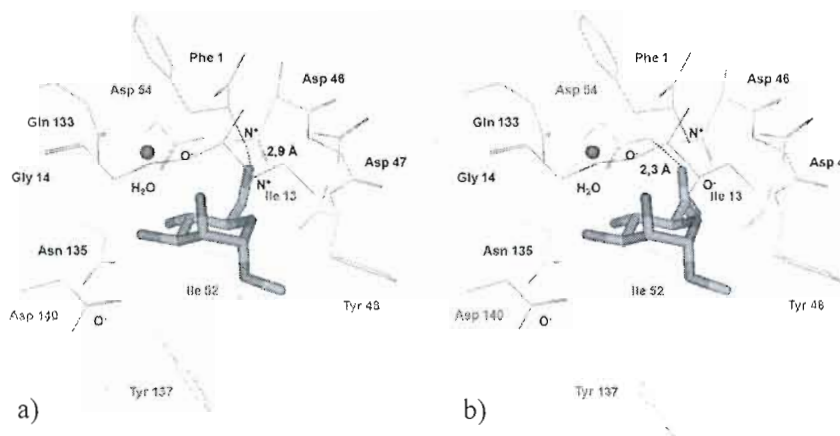


Figure 3.16 Arrimage moléculaire de l'amine **171** et de l'acide carboxylique **172** au FimH.

Comme substitut du groupement alcool en C-6 d'un mannopyrannoside, avait d'abord été synthétisée l'amine à cette position. Par contre, les tests biologiques n'ont révélé aucune activité biologique pour ce composé. Ce résultat n'était pas attendu puisqu'habituellement, de manière classique, les amines sont de bons bioisostères des alcools.¹¹¹ Il faut mentionner qu'à pH physiologique, l'amine se retrouve sous forme protonée. Comme seconde modification, l'alcool en C-6 a été converti en acide carboxylique: un groupe fonctionnel chargé négativement vient remplacer l'amine chargée positivement. Au niveau des tests biologiques c'est une seconde surprise: pas d'activité.

¹¹¹ Patani, G. A., and LaVoie, E. J., *Chem. Rev.*, **1996**, 96, 3147-3176

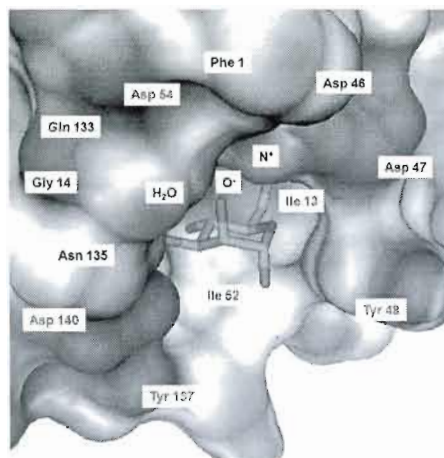


Figure 3.17 Surface accessible au solvant (Connolly) représentant le potentiel électrostatique du complexe FimH-mannose (charges positives rouges, négatives bleues, neutres blanches). L'isoleucine 13 n'a pas été représentée par souci de clarté.

Après ces deux résultats est venu l'arrimage moléculaire pour expliquer les interactions au niveau de la position C-6. Dans le cas du groupement hydroxyle, il s'agit d'un donneur/accepteur de ponts H de charge neutre. Ce dernier peut accepter un pont hydrogène provenant de Phe1 (chargée positivement) et en donner un à Asp54 (chargée négativement). Pour ce qui est de l'amine, elle se protone pour devenir un donneur de ponts H; tandis que l'acide carboxylique se déprotone en carboxylate et devient un accepteur de ponts H. Dans les deux cas (6-NH_3^+ et 6-CO_2^-), la séquence « donneur – accepteur/donneur – accepteur » de ponts H normalement retrouvée avec le groupement hydroxyle est brisée. Mais encore, dans le cas du composé 6-amino, deux charges positives se retrouvent à proximité l'une de l'autre à une distance de 2,9 Å. Inversement, deux charges négatives sont à une distance de 2,3 Å pour ce qui est du carboxylate. Tel qu'énoncé par la loi de Coulomb, deux charges de mêmes signe se repoussent, ce qui donne des interactions défavorables et explique l'absence d'activité de ces deux composés. Remplacer l'hydroxyle en C-6 pour un bioisostère n'est pas chose facile, en plus de tenir compte du volume restreint, il faut tenir compte des charges et des donneurs/accepteurs de ponts H. Un groupement fonctionnel non chargé, de la taille d'un hydroxyle et à la fois donneur et accepteur de ponts H serait potentiellement le meilleur

candidat pour remplacer l'alcool en C-6 d'un mannopyrannoside. Par ailleurs, un 6-thiol pourrait tout aussi bien remplacer un 6-OH.¹¹²

Groupe fonctionnel du composé	Nombre de ponts H prédits	Résidu d'acide aminé / Groupe fonctionnel	Distance entre les atomes d'azote ou d'oxygène
6-OH	3	Phe1 / NH ₃ ⁺	2,9 Å
		Asp54 / CO ₂ ⁻	2,7 Å
6-NH ₃ ⁺	1	Phe1 / NH ₃ ⁺	2,9 Å
		Asp54 / CO ₂ ⁻	2,6 Å
6-CO ₂ ⁻	1	Phe1 / NH ₃ ⁺	3,2 Å
		Asp54 / CO ₂ ⁻	2,3 Å
6-SO ₄ ⁻	3	Phe1 / NH ₃ ⁺	2,7 Å
		Asp54 / CO ₂ ⁻	2,6 Å
6-PO ₄ ²⁻	3	Phe1 / NH ₃ ⁺	3,8 Å
		Asp54 / CO ₂ ⁻	3,1 Å

Tableau 3.7 Distance entre les atomes d'azote et d'oxygène chargés pour différents ligands dont la structure du complexe a été minimisée à l'aide de FITTED 2.5.

Pour remplacer l'hydroxyle en C-6, tout en essayant de faire des interactions plus fortes qu'avec les composés 6-amino et 6-acide carboxylique, ont été minimisés des structures 6-sulfate et 6-phosphate à l'aide de FITTED. En général, l'activité prédite est bonne avec les composés sulfatés en C-6; par contre le K_d du composé **63** est environ 1,5 fois moins bon qu'avec le ManOAll. Pour ce qui est des composés phosphatés en C-6, la tendance générale va avec un plus grand potentiel d'inhibition que ce soit avec les composés **66** ou **79**. Ceci peut s'expliquer par le nombre de ponts hydrogène: en fait que ce soit pour un groupement hydroxyle, sulfate ou phosphate, ils seraient au nombre de 3 (contrairement à 1 pour le 6-amino et le 6-carboxylate). Le phosphate se retrouve à une distance plus grande d'Asp54 comparativement au sulfate (3,1 Å *versus* 2,6 Å), ce qui minimise les interactions défavorables. De plus, le phosphate partage deux charges négatives sur trois atomes

¹¹² Ellis, D., Norman, E. S., and Osborn, H. M. I., *Tetrahedron*, **2008**, 64, 2832-2854

d'oxygène (soit une charge moyenne $-0,5$ par O). D'autre part, le sulfate partage une charge négative par atome d'oxygène (soit une charge moyenne $-0,3$ par O), ce qui rend le phosphate meilleur accepteur de ponts H que le sulfate et peut expliquer sa plus grande activité prédite.

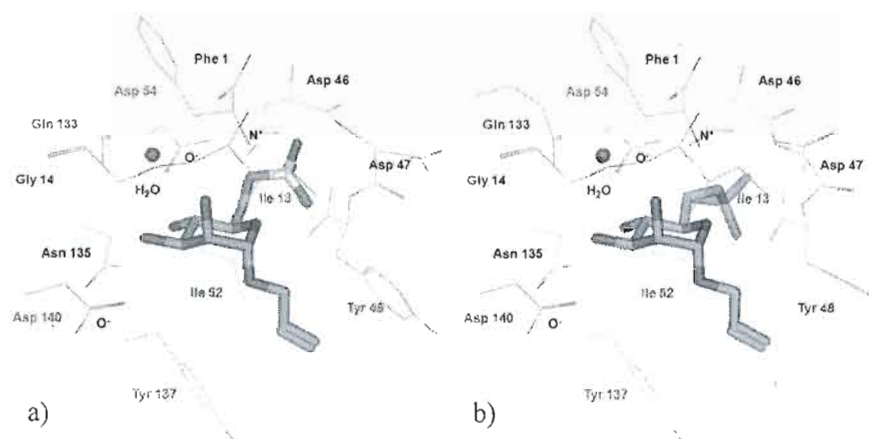


Figure 3.18 Arrimage moléculaire du sulfate 74 et du phosphate 79 au FimH.

CHAPITRE IV

TRAVAUX DIVERS EN MODÉLISATION MOLÉCULAIRE

4.1 INTRODUCTION

Dans la nature, il existe 15 galectines animales ayant divers rôles. Normalement, les galectines sont utiles dans le processus de reconnaissance cellulaire en interagissant avec les glycoprotéines et les glycolipides à la surface. Mais aussi, ces lectines animales interagissent avec les protéines du cytoplasme pour moduler les voies de signalisation. Diverses études avancent l'idée que les galectines jouent un rôle primordial dans le cancer. En effet, ces protéines contribuent aux phénomènes de néoplasie, d'angiogenèse, des métastases et de survie des cellules tumorales.¹¹³ Deux galectines intéressantes font partie de la recherche au laboratoire Roy, il s'agit des galectines-1 et -3. Au niveau du cancer, elles jouent des rôles complètement différents: hGal-1 est pro-apoptotique alors que hGal-3 est anti-apoptotique. L'idée est d'inhiber sélectivement la lectine qui empêche l'apoptose afin que les cellules tumorales puissent subir cette mort cellulaire programmée. Toutefois, les deux galectines sont sélectives aux β -galactopyranosides; alors l'inhibition d'une galectine entraîne l'inhibition de la seconde s'il n'y a pas de sélectivité fine. C'est pourquoi l'étude des similitudes et des différences par modélisation moléculaire est importante dans ce champ de recherche bien précis.

Dans un autre ordre d'idée, la bactérie *Pseudomonas Aeruginosa*, se retrouve un peu partout dans la nature: dans le sol, dans l'eau, dans l'air et dans la nourriture. Cette bactérie opportuniste est responsable de plusieurs infections nosocomiales, notamment chez les patients immunosupprimés. Elle cause surtout des infections pulmonaires, ce qui rend les personnes atteintes de fibrose kystique particulièrement vulnérables. Dans le poumon, *Pseudomonas Aeruginosa* forme un biofilm, sécrète des enzymes d'hydrolyse et des molécules cytotoxiques. Deux lectines bactériennes solubles et dépendantes du calcium sont étudiées chez *P. Aeruginosa*: PA-IL et PA-IIL. La lectine PA-IL se lie spécifiquement au D-

¹¹³ Liu, F.-T., Rabinovich, G. A., *Nature Rev.*, **2005**, 5, 29-41

galactose, mais aussi au L-fucose, à l'adénine, aux antigènes humains communs et se trouve à être particulièrement toxique pour les cellulaires épithéliales pulmonaires. C'est pourquoi l'étude de cette lectine, notamment par modélisation moléculaire, pourrait mener au développement d'un nouveau médicament inhibiteur de PA-IL et augmenter l'espérance et la qualité de vie des patients atteints de fibrose cystique.

4.2 SIMILITUDES ET DIFFÉRENCES ENTRE LES GALECTINES HUMAINES

Afin de compléter une revue déjà avancée par les docteurs Denis Giguère et Subhash Rauthu¹¹⁴, a été faite une petite étude par modélisation moléculaire. Dans la littérature, est retrouvé différentes représentations des trois types de galectines. Toutefois, ces schématisations très simplistes ne rendent pas justice à la complexité du phénomène de reconnaissance d'un sucre par une lectine. Les dessins composés de formes simples ne donnent pas une idée de la structure de la protéine, ni du site de reconnaissance pour les sucres (CRD) ni de l'agencement spatial des dimères. C'est pourquoi ont été construites des images plus complexes à partir des structures obtenues par diffraction des rayons-X.

¹¹⁴ Rauthu, S., Giguère, D., Rocheleau, S., and Roy, R., *À publier*

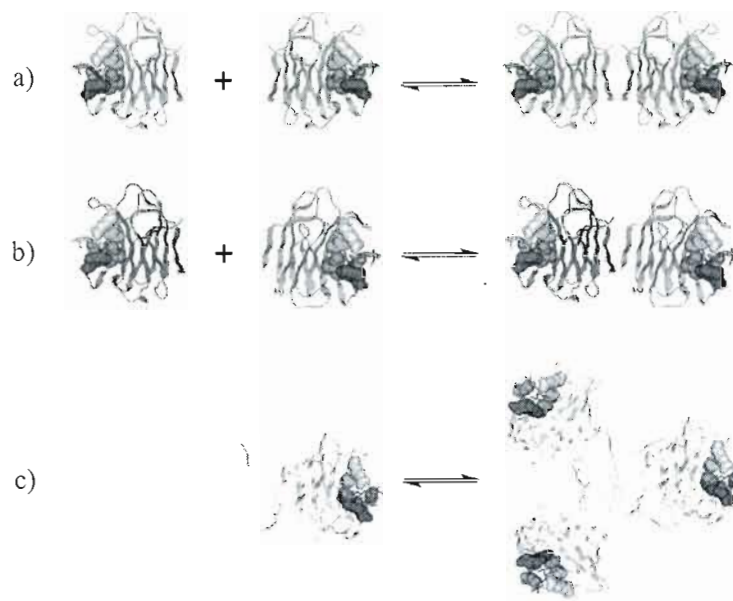


Figure 4.1 Schématisation des trois types de galectines: a) homodimère (ou proto) b) hétérodimère (ou tandem répété) c) type chimère.

De cette manière, il est possible de bien distinguer le CRD composé de six résidus d'acides aminés hautement conservés par les surfaces colorés. Les rubans donnent une meilleure idée de la structure des galectines, de l'emplacement du CRD ainsi que de la structure générale des dimères. Par contre, pour ce qui est du type chimère, les chaînes du N-terminal devrait être tressées ensemble afin que ce soit représentatif de la réalité (pour en faire une structure du type bouquet). Les images de l'homodimère et de l'hétérodimère sont basées sur la structure de hGal-2 (2NN8)¹¹⁵, alors que l'image de type proto sur la structure vient de hGal-4 (1X50)¹¹⁶.

Par la suite, ont été revues les interactions sucre-galectine: soit les interactions d'une galectine avec différents ligands et d'un ligand avec différentes galectines. Dans un premier temps hGal-3 a été choisie complexant de l'eau, le Lac, le LacNAc et un dérivé du LacNAc. Les acides aminés impliqués dans une interaction directe (ou indirecte avec une molécule d'eau) avec le ligand sont assez conservés. En fait, dans le cas de hGal-3, sept résidus

¹¹⁵ Collins, P. M., Hidari, K. I. P. J., and Blanchard, H., *Acta Cryst. D*, **2007**, 63, 415-419

¹¹⁶ Tomigawa, T., Kigawa, T., Saito, K., Koshiba, S., Inoue, M., and Yokoyama, S., *À publier*

d'acides aminés sont hautement conservés: His158, Asn160, Arg162, Glu165, Asn 174, Trp181 et Glu184. Aussi, une molécule d'eau semble particulièrement importante en faisant un réseau de ponts hydrogène entre Arg144, Asn160, OH-3' et OH-4'. Au niveau des interactions, il n'y a pas tant de différence entre le Lac et le LacNAc, sauf quelques molécules d'eau non-conservées. Toutefois, l'activité biologique du LacNAc avec un K_d de $67\mu\text{M}$ est environ trois fois meilleure qu'avec le lactose avec un K_d de $220\mu\text{M}$.¹¹⁷ Par contre, chez le dérivé tétrafluorobenzamido du LacNAc, il y a gain important d'interactions hydrophobes avec Ala146, Ile145 et Arg144. En fait, avec l'arginine 144 il y a un changement conformationnel qui permet une interaction π -cation supplémentaire à une distance d'environ $3,6\text{ \AA}$. Cette interaction semble contradictoire, puisque normalement ce sont des interactions de type π -anion qui se font avec les composés perfluoroaromatiques. En fait, c'est le carbone du groupement guanidine qui se trouve presque au centre du noyau aromatique, alors que les trois atomes d'azote se partageant la charge positive sont plutôt superposés au-dessus des atomes de fluor. Quand à l'activité biologique, elle est environ 250 fois meilleure avec un K_d de $0,88\text{ }\mu\text{M}$ et ceci pourrait être expliqué par la désolvatation du groupement perfluoroaromatique plus que l'interaction π -cation supplémentaire.¹¹⁸

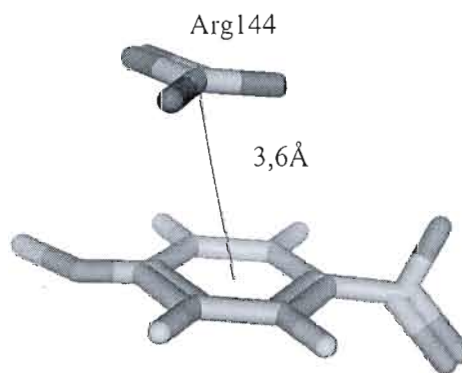


Figure 4.2 Interactions π -cation entre Arg144 et le dérivé tétrafluorobenzamido du LacNAc (code PDB 1KJR).¹¹⁸

¹¹⁷ Tejler, J., Leffler, H., and Nilsson, U. J., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, 15, 2343-2345

¹¹⁸ Sörme, P., Arnoux, P., Kahl-Knutsson, B., Leffler, H., Rini, J. M., and Nilsson, U. J., *JACS*, **2005**, 127, 1737-1743

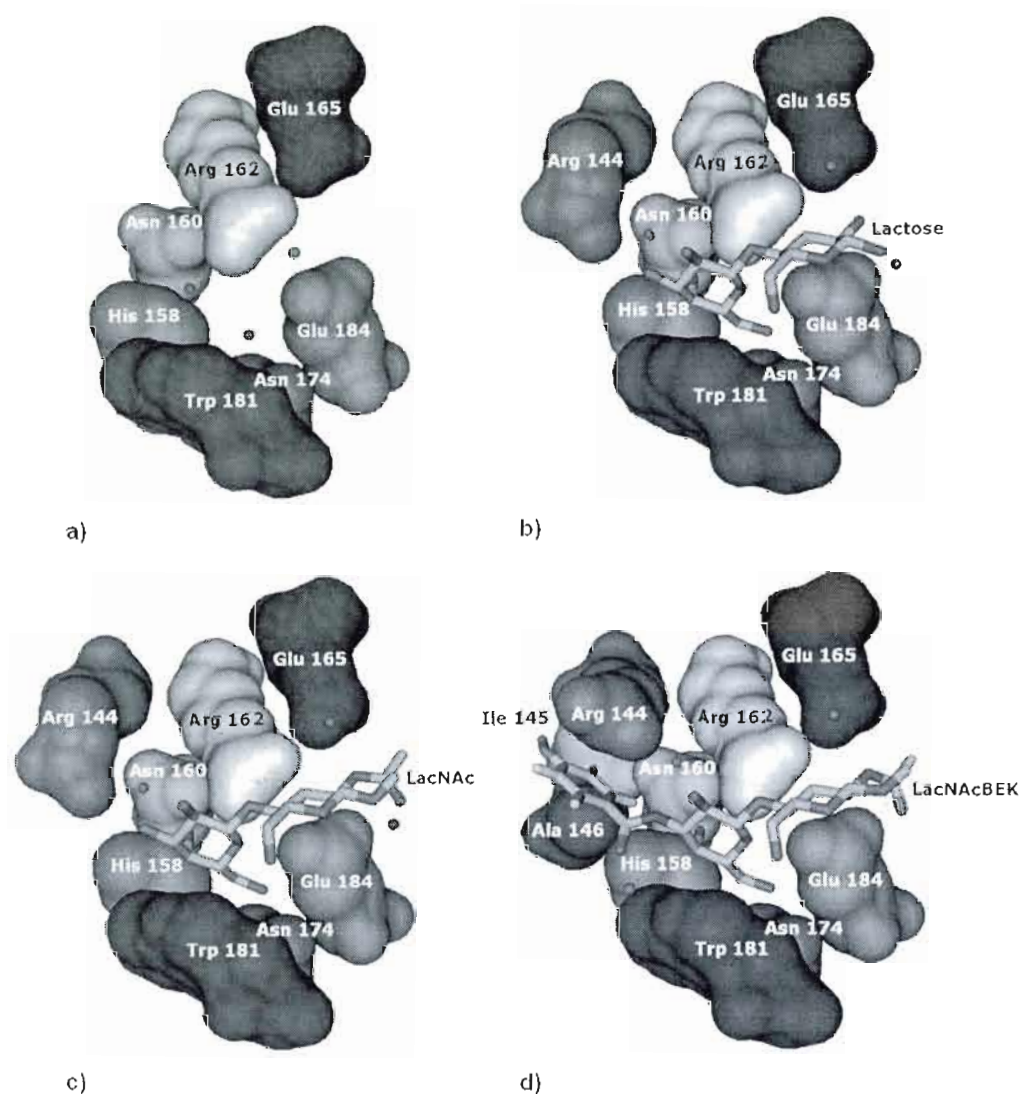


Figure 4.3. hGal-3 complexée avec: a) 3 molécules d'eau (code PDB 2NMO)¹¹⁵
 b) le lactose (code PDB 2NN8)¹¹⁵ c) le LacNAc (code PDB 1KJL)¹¹⁸
 d) le 3'-(4-méthoxy-2,3,5,6-tétrafluorobenzamido)-N-acétyllactosamine
 ou LacNAcBEK (code PDB 1KJR)¹¹⁸.

Dans un deuxième temps, les interactions entre le lactose et différentes galectines humaines (-1, -2, -3, -7, -8 et -9) ont été comparées. Il a été remarqué que six résidus d'acides aminés sont hautement conservés: His49, Asn51, Arg53, Asn62, Glu72, et Trp69 (numérotation selon hGal-7). Par contre, la molécule d'eau hautement conservée chez les

différents complexes de la galectine-3 humaine ne l'est pas nécessairement chez les autres galectines. En plus des six conservés, d'autres résidus d'acides aminés peuvent venir faire des interactions supplémentaires avec le lactose. Le plus souvent ce sont des arginines (hGal-2, hGal-3, hGal-8 et hGal-9), mais aussi une histidine (hGal-1) ou un glutamate (hGal-3).

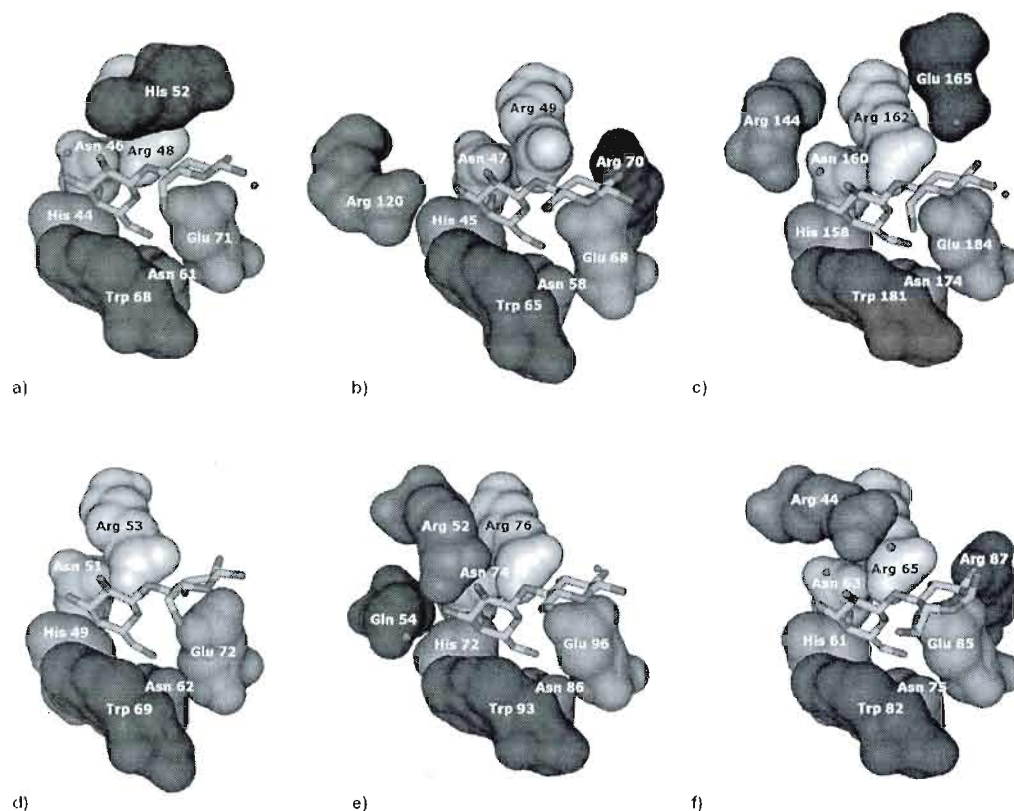


Figure 4.4 Lactose complexé avec: a) hGal-1 (code PDB 1GZW)¹¹⁹ b) hGal-2 (code PDB 1HLC)¹²⁰ c) hGal-3 (code PDB 2NN8)¹¹⁵ d) hGal-7 (code PDB 4GAL)¹²¹ e) hGal-8 (code PDB 2YXS)¹²² f) hGal-9 (code PDB 2EAK)¹²³.

¹¹⁹ López-Lucendo I, M. L., Solís, D., André, S., Hirabayashi, J., Kasai, K.-I., Kaltner, H., Gabius, H.-J., and Romero, A., *J. Mol. Biol.*, **2004**, 343, 957-970

¹²⁰ Lobsanov, Y. L., Gittin, N. A., Leffler, H., Barondes, S. H., and Rini, J. M., *J. Biol. Chem.*, **1993**, 268, 27034-27038

¹²¹ Leonidas, D. D., Vatzaki, E. H., Vorum, H., Celis, J. E., Madsen, P., and Acharya, K. R., *Biochemistry*, **1998**, 37, 13930-13940

¹²² Kishishita, S., Nishino, A., Murayama, K., Terada, T., Shirouzu, M., and Yokoyama, S., *Riken Structural Genomics/Proteomics Initiative*, **2007**

¹²³ Nagae, M., Nakamura-Tsuruta, S., Nishi, N., Hirabayashi, J., Wakatsuki, S., and Kato, R., *J. Mol. Biol.*, **2008**, 375, 119-135

Il est intéressant de constater à quel point les six acides aminés sont conservés dans la séquence de la protéine. Dans une première région, His49, Asn51 et Arg53 (numérotation selon hGal-7) se retrouvent alignés. Il s'en suit une seconde région variable où peuvent s'ajouter certains des résidus d'acides aminés supplémentaires (hGal-1 et hGal-2). La dernière région contient Asn62, Glu72, et Trp69 (numérotation selon hGal-7) bien alignés.

Le tableau suivant résume les interactions conservées avec le Lac chez les galectines humaines étudiées. Les interactions très variables ont été omises par souci de clarté.

Galectine Code PDB	hGal-1 1GZW	hGal-2 1HLC	hGal-3 2NN8	hGal-7 4GAL	hGal-8 2YXS	hGal-9 2EAK
Résolution	1,70 Å	2,90 Å	1,35 Å	1,95 Å	2,13 Å	1,97 Å
Nbre d'a.a. impliqués	7 a.a.	8 a.a.	8 a.a.	6 a.a.	8 a.a.	8 a.a.
Eau impliquée	2 H ₂ O	- ^a	3 H ₂ O	-	2 H ₂ O	2 H ₂ O
CH- 3',4',5'	Trp68	Trp65	Trp181	Trp69	Trp93	Trp82
OH-3'	H ₂ O	Arg120	H ₂ O	-	Gln54 ^b	Asn63 ^b
OH-4'	H ₂ O	-	Arg144 ^b	-	Arg52	Arg44 ^b
	His44	His45	His158	His49	His72	His61
	Asn46	Asn47	Asn160	Asn51	Asn74	Asn63 ^b
	Arg48	Arg49	Arg162	Arg53	Arg76	Arg65
O-5'	Arg48	-	Arg162	Arg53	Arg76	Arg65
OH-6'	Asn61	Asn58	Asn174	Asn62	Asn86	Asn65
	Glu71	Glu68	Glu184	Glu72	Glu96	Glu75
O-1	His52	-	-	-	-	-
OH-2	Glu71 ^b	Arg70	Glu165 ^b	-	Glu96 ^b	Arg87
OH-3	Arg48	Arg49	Arg162	Arg53	Arg76	Arg65
	Glu71	Glu68	Glu184	Glu72	Glu96	Arg87

Tableau 4.1 Comparaison des interactions conservées de différents complexes de hGal.

^a Pas de H₂O présent dans le fichier PDB (résolution de 2,90 Å).

^b Pont hydrogène indirectement *via* une molécule d'eau.

Le groupement alcool axial de la partie galactose est impliqué dans 3 ou 4 ponts hydrogène et les interactions CH- π avec le tryptophane semblent être des éléments essentiels dans la reconnaissance lectine-sucre. Aussi, les interactions avec OH-6', OH-3, O-5' sont importantes pour maintenir le sucre dans le site d'interaction, puisque ces interactions sont

très conservées. Les autres fonctions alcool du lactose semblent jouer un rôle beaucoup moins ou pas du tout important. En fait, la partie galactose du lactose est plus importante que la partie glucose en termes d'interactions.

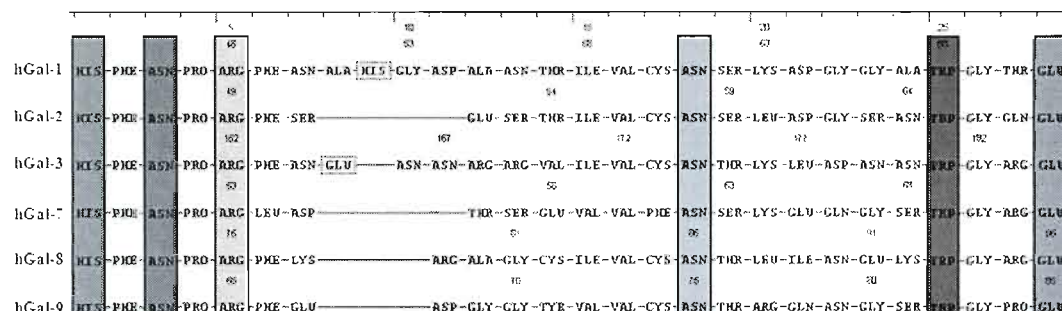


Figure 4.5 Alignement des six acides aminés conservés chez différentes galectines humaines.

La reconnaissance moléculaire des galectines est spécifique aux β -galactopyranosides, seule une unité galactose possède la bonne configuration pour le site d'interaction. Dans le cas d'un β -glucopyranoside, par exemple, la fonction alcool en C-4 est équatoriale et implique une interaction défavorable avec le tryptophane. Dans les sucres courants, seul un β -mannopyranoside pourrait hypothétiquement remplacer l'unité galactose. En fait, avec une rotation de 120° sur lui-même, l'alcool axial en C-2 du mannose peut venir superposer la position en C-4 du galactose.

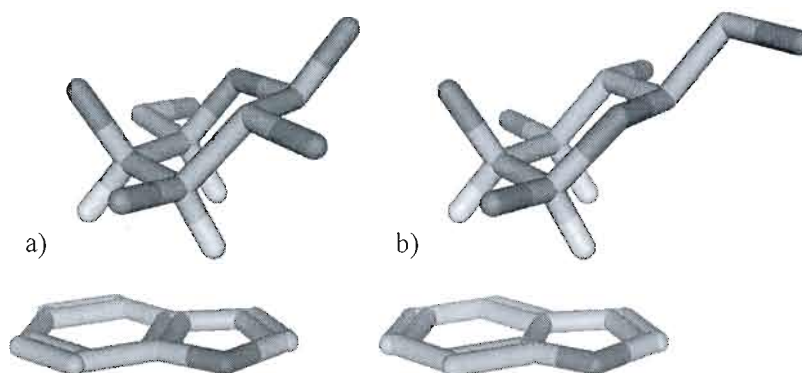


Figure 4.6 Interactions CH- π entre le tryptophane chez les galectines humaines et
a) un β -galactose¹²⁴ (code PDB 1KJL) b) un β -mannose.
Ces interactions se font à une distance d'environ 3Å.

¹²⁴ Ramirez-Gualito, K, Alonso-Rios, R., Quiroz-Garcia, B., Rojas-Aguilar, A., Diaz, D., Jiménez-Barbero, J., and Cuevas, G., *JACS*, **2008**, 73, 849-857

En fait, un β -mannose dans cette position possède la même configuration (un OH axial et trois CH pointant vers le bas) qu'un β -galactose. Par contre, il y a perte d'importantes interactions, soit les ponts hydrogène avec OH-6' et O-5' comparativement au lactose.

4.3 MINIMISATION DE L'ÉNERGIE DE DENDRIMÈRES

Dans le but d'apporter des données complémentaires à un article scientifique traitant d'inhibiteurs de PA-IL¹²⁵ écrit par le docteur Yoann Chabre, a été faite une seconde étude par modélisation moléculaire. La structure de la lectine étant déjà connue, une première question était d'expliquer l'activité biologique du meilleur inhibiteur (un dérivé acide) synthétisé au laboratoire par le docteur Denis Giguère. De plus, il était question de savoir si l'effet dendritique (ou multivalence) de molécules connues pouvait arriver à lier doublement un tétramère de la PA-IL ou bien lier plus d'une lectine à la fois pour former un amas (*cluster*).

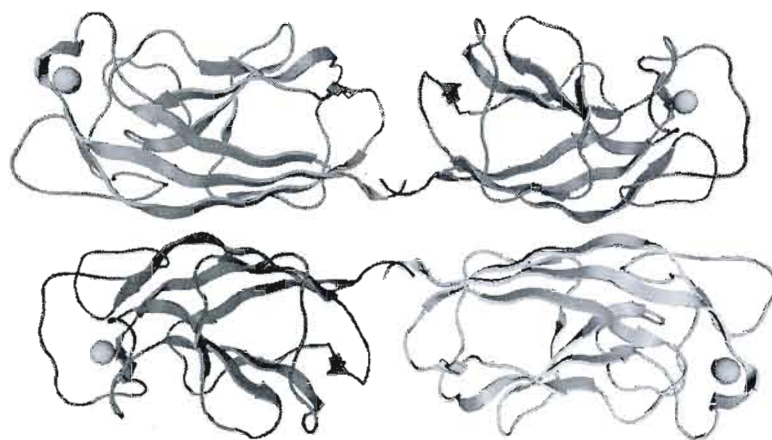


Figure 4.7 Tétramère de la PA-IL avec ses ions Ca^{2+} (code PDB 1OKO).¹²⁶

¹²⁵ Chabre, M. Y., Giguère, D., Blanchard, B., Rodrigue, J., Rocheleau, S., Neault, M., Papadopoulos, A., Arnold, A. A., Imbert, A., and Roy, R., *À publier*

¹²⁶ Cioci, G., Mitchell, E. P., Gautier, C., Wimmerová, M., Sudakevitz, D., Pérez, S., Gilboa-Garber, N., and Imbert, A., *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.*, **2003**, 555, 297-301

Tout d'abord, ont été comparées les interactions entre le glucose et le dérivé acide.

Code PDB (ou nom)	1OKO	dérivé acide 173 ¹²⁵
Résolution	1,60 Å	-
Nbre d'a.a. impliqués ^a	9 a.a.	10 a.a.
Eau impliquée	1H ₂ O	2H ₂ O
CH ₂ -6	Val101	Val101
OH-6	His50 Pro51 ^b Gln53 ^(b)	His50 Pro51 ^b Gln53 ^(b)
O-5	-	-
OH-4	Ca ²⁺ Tyr36 Asp100	Ca ²⁺ Tyr36 Asp100
OH-3	Ca ²⁺ Asn107	Ca ²⁺ Asn107
OH-2	Asn107	Asn107 COO ⁻ ^(b)
OH-1	-	-
Ph	-	(Tyr36) Pro38 (Trp42) His50
COO ⁻	-	OH-2 ^(b)

Tableau 4.2 Interactions du D-galactose et du dérivé acide 173 avec le PA-IL.

^a En incluant les acides aminés complexés à l'ion calcium.

^b Pont hydrogène indirectement *via* une molécule d'eau.

Il est intéressant de remarquer combien la reconnaissance moléculaire d'une unité galactose est différente d'une lectine à l'autre. Ici, il n'y a pas de tryptophane sur lequel est assis le sucre par des interactions CH- π . En fait, c'est par l'ion calcium qu'OH-3 et OH-4 sont complexés. De plus, OH-4 est reconnu par le carboxylate d'Asp100 ainsi que par le carbonyle de la chaîne latérale de Tyr36. Le groupement OH-2 fait un pont hydrogène directement avec Asn107, tandis que OH-6 c'est avec His50, Gln53 (directement et indirectement) et indirectement avec Pro51. Contrairement aux galectines, l'oxygène endocyclique n'implique aucune interaction importante avec le PA-IL. La reconnaissance moléculaire se fait donc de manière latérale, c'est-à-dire qu'il n'y a aucune interaction au-dessus ni en dessous du ligand, comparativement aux galectines (Trp en dessous et Arg au

dessus). Le groupement OH-1 est libre d'interactions, ce qui permet de faire toutes sortes de modifications. Comme chez le FimH, OH-6 se trouve dans la configuration *tg*, le CH₂ étant orienté vers la valine 101

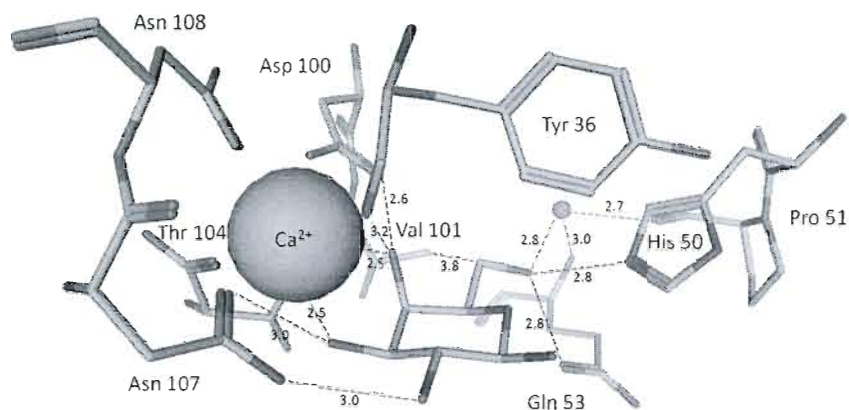


Figure 4.8 Modélisation des interactions entre PA-IL et le D-galactose (code PDB 1OKO).¹²⁶

Avec le dérivé acide **173**, les interactions avec le PA-IL sont les mêmes qu'avec le galactose. Mais en plus, la partie phényle fait des interactions hydrophobes avec Pro38 et His50, soit sous sa forme neutre avec une interaction NH- π ou sous sa forme acide avec une interaction π -cation. Avec un pKa d'environ 6,8 l'histidine est proche de la neutralité, mais peut aussi bien se protoner, du moins partiellement. La fonction acide carboxylique sous forme de carboxylate vient établir un pont hydrogène intramoléculaire directement avec OH-2 (ou possiblement *via* une molécule d'eau). Cette interaction semble à première vue inutile puisqu'intramoléculaire, mais il suffit de voir les résultats d'activité biologique d'autres dérivés de ce genre pour en comprendre l'importance.

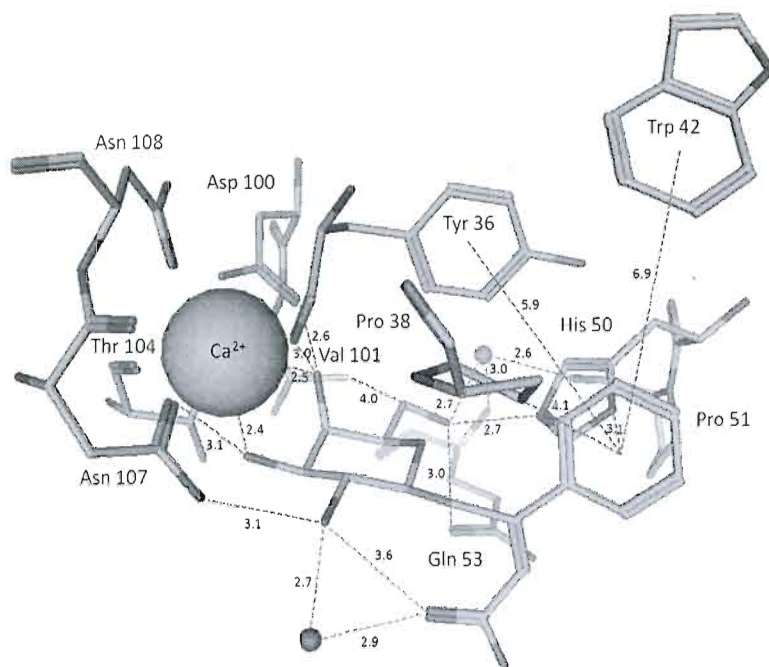


Figure 4.9 Modélisation des interactions entre PA-IL et l'acide (*E*)-2-benzène-4-(β -D-galactopyrannosyl)-but-2-énique **173**.¹²⁵

D'après les valeurs d'activité biologique (IC_{50} et K_d) du tableau 16, l'association lectine-ligand serait possiblement favorisée par la force du pont hydrogène intramoléculaire ainsi que par la géométrie du groupement en question. Par exemple, le dérivé méthyl ester est seulement un accepteur de ponts H *via* le carbonyle. Les dérivés amide et méthylamide sont aussi accepteurs de ponts H *via* le carbonyle, mais en plus donneurs *via* le NH ou le NH_2 . Mais encore, le carboxylate possède une charge négative délocalisée entre deux atomes d'oxygène, ce qui le rend un meilleur accepteur de ponts H par rapport à un carbonyle neutre. Aussi, par une rotation de 180° sur lui-même, l'équivalent est retrouvé étant donné la symétrie de type C_2 intrinsèque aux ions carboxylates.

L'activité biologique mesurée (en valeurs d' IC_{50} et de K_d) suit la tendance générale $COOMe > CONH_2 > CONHMe > COO^-$ et comme déjà mentionné viendrait de la force du pont hydrogène intramoléculaire. En fait, plus ce lien non-covalent est fort, plus la distance entre le groupement en question et OH-2 est courte et cela a un effet sur le groupement

phényle. Plus cette distance est courte, plus l'angle du phényle penche vers l'arrière, ce qui permettrait des interactions hydrophobes plus efficaces.

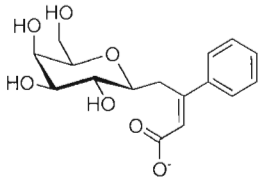
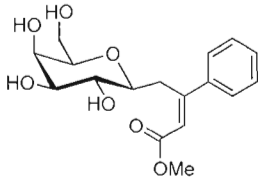
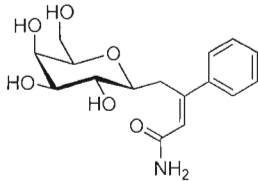
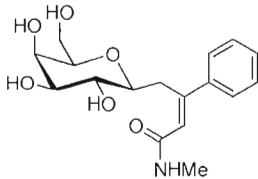
Molécule	IC ₅₀ (déterminés par ELLA)	K _d (déterminés par ITC)
 173	170 µM	37 µM
 174	720 µM	452 µM
 175	210 µM	161 µM
 176	250 µM	81 µM

Tableau 4.3 Comparaison des activités biologiques de différents dérivés galactosyles.¹²⁵

À la figure suivante, est montrée la surface accessible au solvant (la surface de Connolly) ainsi que la polarité des résidus d'acides aminés environnants. La partie phényle vient s'insérer parfaitement dans une cavité hydrophobe délimitée par la proline 38 au-dessus, l'histidine 50 en-dessous ainsi que la tyrosine 36 à l'arrière et le tryptophane 42 un peu plus loin.

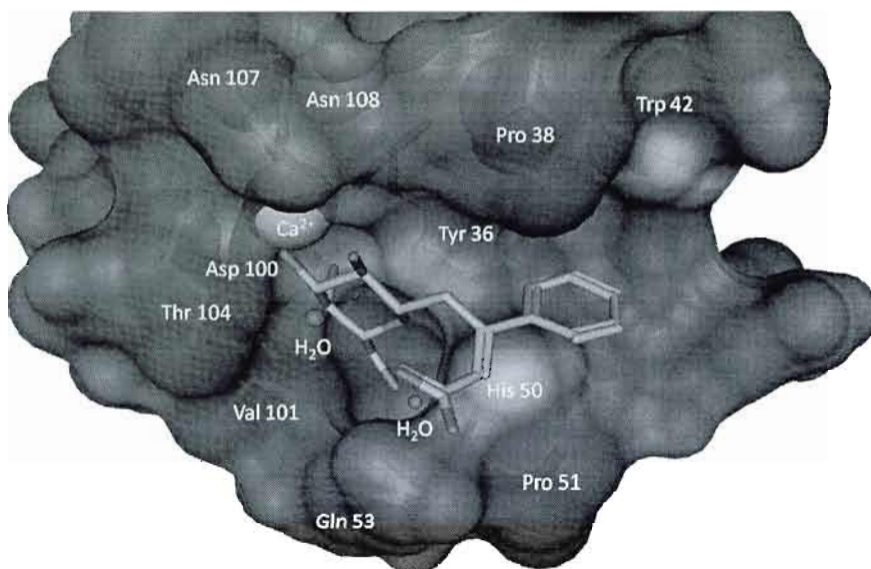


Figure 4.10 Modélisation des interactions entre PA-IL (surfaces de Connolly) et l'acide (*E*)-2-benzène-4-(β-D-galactopyrannosyl)-but-2-énique.¹²⁵

Après modélisation des interactions entre la lectine et le ligand **173** (un monomère), a été modélisée la structure du glycodendrimère **177**. Une première question était de savoir avec quel angle les fonctions amides devraient être modélisées. Pour ce faire, a d'abord été trouvé dans la littérature un cœur le plus représentatif possible.



Figure 4.11 Structure rayons-X du tris(*N,N*-diéthyl)-trimésamide.¹²⁷

¹²⁷ Cannon, A. S., Foxman, B. M., Guarrera, D. J., and Warner, J. C., *Cryst. Growth Des.*, **2005**, 5, 407-411

A été trouvée dans la littérature la structure obtenue par diffractions des rayons-X du tris(*N,N*-diéthyl)-trimésamide cristallisé avec l'hydroquinone dans un rapport 1:1. Les angles formés par les carbonyles sont de $+60^\circ$, -47° , et -51° dans une conformation « haut-haut-bas ». Ces angles ont donc été utilisés directement lors de la modélisation du glycodendrimère.

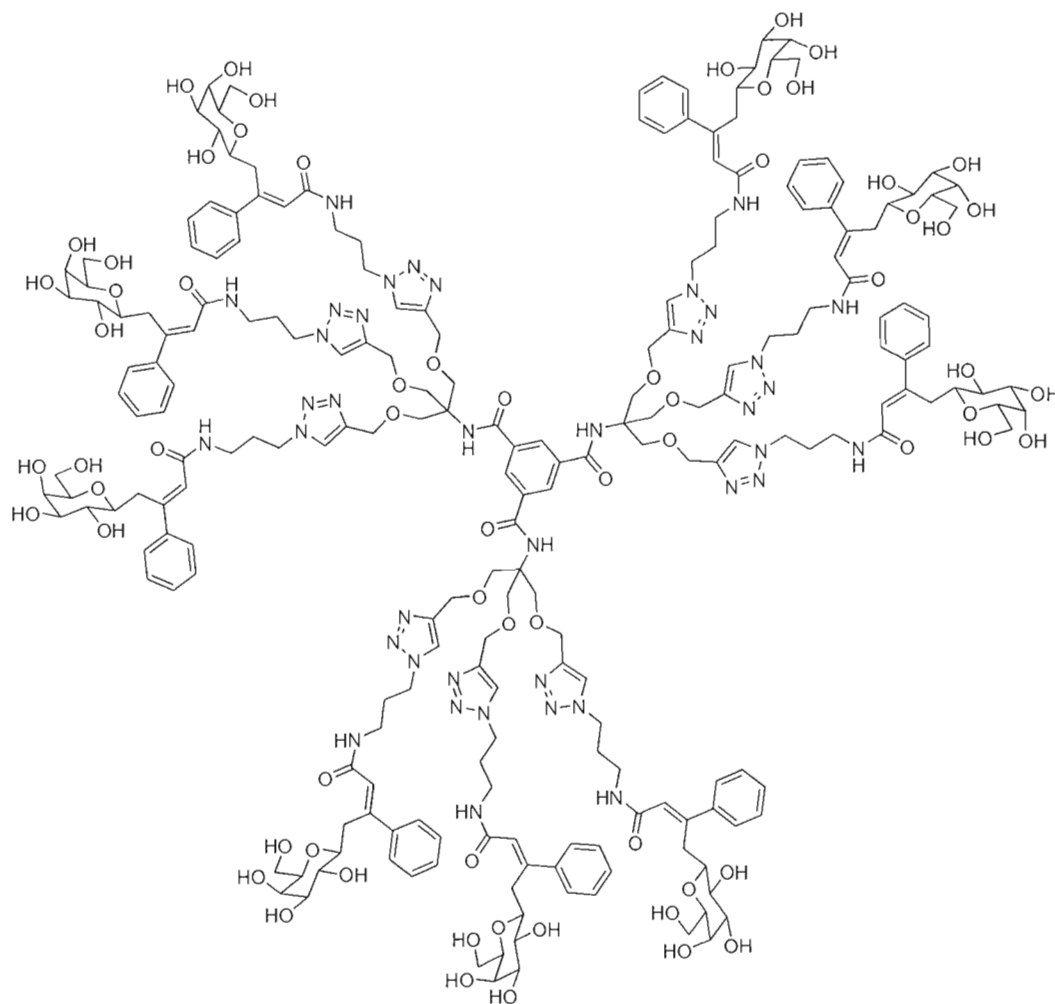


Figure 4.12 Structure bidimensionnelle du glycodendrimère 177.¹²⁵

En premier lieu, l'unité galactosyle a été construite à l'aide du logiciel MOE 2007.09 avec un angle *exo*-anomérique ajusté à 180° , puis minimisée, ce qui a mené à la formation du pont hydrogène intramoléculaire. La fonction alcool primaire en C-6 a été orientée dans la configuration *gt*, tout comme dans la structure rayons-X IOKO. La partie aglycone a été minimisée à l'aide du champ de force moléculaire de Merck (MMFF94X) tandis que l'unité galactosyle l'a été avec le champ de force fonction de l'énergie potentielle des alcools et des sucres (PEF95SAC).

Pour ce qui est des unités triazoles, deux rotamères sont possibles et l'angle de torsion C-C-N-N optimal a été déterminé comme étant près de 0° . Cette conformation verrouillée, cela permet à la structure finale d'être moins aplatie sur elle-même et, par conséquent, d'avoir une répulsion minimale entre les six branches et donc une distance maximale entre les sucres.

Un premier cœur a été construit avec tous les atomes dans le même plan. De cette manière, une symétrie parfaite est générée entre les six branches et permet de simplifier leur construction. À cette étape, il y a deux branches qui pointent vers le haut et une branche vers le bas dans une conformation alternant haut et bas. Encore une fois, deux rotamères sont possibles pour les unités triazoles par rapport au bout des branches et l'angle de torsion N-C-C-N optimal a été déterminé comme étant près de 0° avant minimisation. Avec un angle de 180° , cela oriente les sucres de manière énergétiquement peu favorable sur la structure finale. Après la construction d'une première branche, les cinq autres branches ont été construites en superposant la première par les unités triazoles, ce qui a donnée la première structure finale possédant une énergie potentielle calculée de 1496 kcal/mol.

La seconde structure du glycodendrimère a été modélisée directement à partir du cœur trimésamide remplaçant le premier cœur plan. Par la suite, les branches ont été connectées à partir des triazoles du premier glycodendrimère et minimisées. Après quelques ajustements d'angles de torsion et d'autres minimisations d'énergie, une structure presque symétrique qui possède une énergie potentielle calculée de 697 kcal/mol a été obtenue.

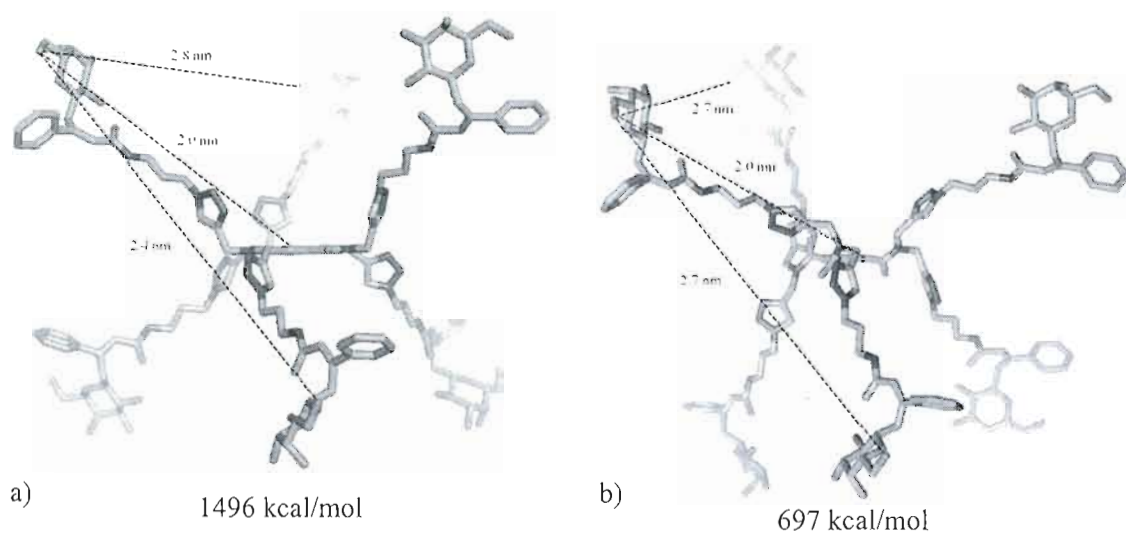


Figure 4.13 Modèle moléculaire du glycodendrimer **177** construit à partir:
a) d'un cœur complètement planaire b) du cœur trimésamide.¹²⁵

Suite à cela, la simulation de complexes monovalents, divalents et hexavalents avec le PA-IL tétramérique a été exécutée par superposition de chaque unité galactosyle sur les unités galactose. Après suppression des atomes superflus, les images finales ont été obtenues à l'aide de la version 0.99rc6 du logiciel PyMOL.

Pour le conformère « cœur planaire », la distance entre deux sucres de conformation « haut et bas » est de 2,4 nm; entre deux sucres de conformation « haut et haut » ou « bas et bas » elle est de 2,8 nm; le rayon à partir du centre du cœur étant de 2,0 nm. Pour le conformère « cœur trimésamide », la distance entre deux sucres de conformation « haut et bas », de 2,7 nm; entre deux sucres de conformation « haut et haut » ou « bas et bas » est de 2,7 nm, le rayon à partir du centre du cœur étant de 2,0 nm. Toutes ces mesures ont été prises à partir d'OH-6.

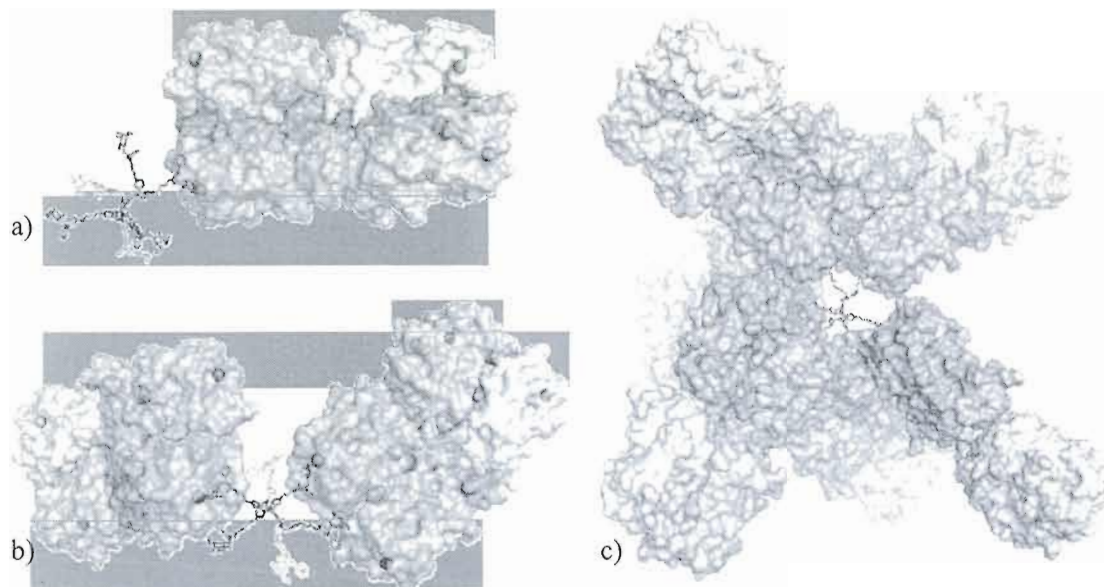


Figure 4.14 Simulation de complexes: a) monovalent b) divalent et c) hexavalent entre le glycodendrimer **177** et la PA-IL tétramérique obtenus par modélisation moléculaire.¹²⁵

Une expérience de diffusion par RMN de PFG-STE utilisant la BPP-LED a été réalisée par le collaborateur Alexandre Arnold. Avec le glycodendrimer **177** solubilisé dans le DMSO- d_6 à 25°C, la RMN a permis d'évaluer que le rayon solvodynamique moyen était de 1,4 nm.¹²⁵ Ce résultat est en fait très consistant avec la valeur des structures obtenues par modélisation moléculaire. Ces dernières étant de conformation étendue (*full extended*), la distance mesurée est en fait la valeur maximale résultant de l'expérience. Une valeur de 1,4 nm signifie que le dendrimer en solution se retrouve un peu plus écrasé sur lui-même par rapport à la structure modélisée.

Par une expérience d'ITC, le ratio ligand/protéine a été déterminé et vaut $0,22 \pm 0,05$. Cette valeur signifie qu'il y a en moyenne environ 5 lectines PA-IL pour un glycodendrimer **177** avec une distribution qui varie de 3 à 6 lectines par ligand. Ce qui démontre hors de tout doute que les complexes divalents existent et même que les complexes hexavalents sont possibles même si ce derniers ne sont pas favorisés d'un point de vue thermodynamique.

CHAPITRE V

CONCLUSION GÉNÉRALES

En définitive, à l'aide du logiciel MOE 2007.09 a été élaboré un modèle QSAR qui possède la capacité de prédire le K_d pour des mannopyrannosides vis-à-vis l'inhibition de l'adhésine FimH. L'ensemble d'entraînement comprend 81 mannopyrannosides tirés de la littérature ou bien synthétisés et testés au laboratoire Roy. La minimisation des structures complexe-ligand a été faite à l'aide du logiciel FITTED 2.5 qui utilise un algorithme génétique Lamarckien afin de simplifier le problème et ainsi sauver du temps de CPU. La recherche de descripteurs moléculaires s'est effectuée à l'aide du script SVL QuaSAR-Evolution - RSI 2004.10.01. Le modèle mathématique de prédiction du K_d possède finalement 14 variables, ce qui est relativement simple, mais pas facilement rationalisable (interprétable).

La valeur de K_d prédite pour plusieurs molécules a été calculée pour le modèle et montre une tendance de meilleure activité pour les dérivés 1-*O*-allylés que pour les 1-*O*-méthylés, ce qui était évidemment attendu. La modification en position C-2 montrant le meilleur potentiel d'inhibition est le dérivé éthylhydroxyle avec un K_d prédit nettement sous le nanomolaire. L'arrimage moléculaire montre qu'il y aurait effectivement substitution de la molécule d'eau par l'alcool primaire de ce dernier dérivé. Quant aux modifications en position C-6, les sulfates et les phosphates montrent en général les meilleurs potentiels d'inhibition, plus particulièrement du phosphate par rapport au sulfate. L'arrimage moléculaire prédit un plus grand nombre de ponts H avec ces deux groupements. Aussi, il y aurait une plus grande distance entre le carboxylate et le phosphate qu'avec les autres groupes fonctionnels calculés.

Par contre, certaines valeurs de K_d prédites ne semblent pas logiques: la molécule **37** est active alors que la **168** est inactive; **63** est plus basse que la référence alors que **74** non, etc. Ce qui remet en questionnement la validité du modèle QSAR: est-ce qu'un modèle prédictif se basant sur un ensemble d'entraînement composé exclusivement de mannopyrannosides modifiés en C-1 peut prédire avec exactitude des mannopyrannosides

modifiés en C-2 ou C-6? Si tel est le cas, la solution serait de synthétiser plusieurs autres mannopyrannosides afin que l'ensemble d'entraînement soit plus représentatif de l'ensemble d'évaluation.

Du côté du laboratoire, toutes les molécules ont été synthétisées sans problème, excepté le phosphate **77**, où le groupement 1-*O*-allyle a été déprotégé. Si la synthèse du composé **77** était à refaire, il faudrait revoir la stratégie de synthèse s'il n'est pas possible de faire l'hydrolyse du diéthyl phosphate en phosphate sans toucher à l'allyle anomérique. La synthèse des composés difluoré **87** et trifluoré **88** en C-6 n'a pas été faite, mais serait très envisageable à partir de l'aldéhyde et de l'acide carboxylique, en utilisant comme agent fluorant le DAST et le Deoxo-Fluor toujours. Pour ce qui est de stratégies de protection/déprotection, il s'agit d'étapes par lesquelles il faut souvent passer, mais qui coûtent en temps et réactifs. Il est avantageux de pouvoir éviter ces étapes, si cela ne complique pas la purification subséquente. Un bon compromis serait, si cela est possible, de faire comme dans la synthèse du composé **85** et ne protéger que les alcools trop réactifs qui peuvent nuire à la réaction.

CHAPITRE VI

PARTIE EXPÉRIMENTALE

La nomenclature utilisée a été adaptée de celle publiée en anglais: "International Union of Pure and Applied Chemistry and International Union of Biochemistry and Molecular Biology" Nomenclature of carbohydrates, *Journal of Carbohydrate Chemistry*, **16**, 1191-1280 (1997).

6.1 GÉNÉRALITÉS

6.1.1 Solvants

Les solvants sont distillés¹²⁸ comme indiqué ci-dessous puis conservés sur tamis moléculaire, sur hydroxyde de potassium ou sur hydrure de calcium. Le dichlorométhane est distillé sur anhydride phosphorique (P_2O_5). La pyridine est distillée sur hydroxyde de potassium. Le toluène est distillé sur hydrure de calcium. Le THF est distillé sur sodium/benzophénone et l'éther sur hydrure de lithium-aluminium. Le DMF est distillé sur ninhydrine puis conservé sur tamis moléculaire. L'acétone est séchée sur sulfate de calcium. Le méthanol est distillé sur sodium métallique et conservé sur tamis moléculaire. Les solvants employés pour la chromatographie sont de qualité ACS et n'ont pas été distillés avant leur utilisation. Les solvants sont évaporés sous pression réduite (trompe à eau).

¹²⁸ Perrin, D. D, Armarego, W. L. F., and Perrin, D. R., Purification of Laboratory Chemicals., **1997**, Pergamon Press Publishing

6.1.2 Chromatographie

Le progrès des réactions est suivi par chromatographie sur couche mince (CCM) sur plaque de gel de silice (Merck 60 F₂₅₄) en utilisant des systèmes d'éluants appropriés. La révélation est effectuée par irradiation sous lumière UV ($\lambda = 254$ nm) et par trempage dans des révélateurs spécifiques, un mélange acide (acide sulfurique/méthanol/eau : 5/45/45 ; v/v/v) pour les composés protégés ou une solution oxydante de molybdate (préparée à partir de 25 g de molybdate d'ammonium et de 10 g de sulfate cérique dissous dans 900 ml d'eau et 100 mL d'acide sulfurique concentré), puis par chauffage à 300°C. Les séparations par chromatographie rapide sont réalisées sous pression d'air comprimé sur colonne de gel de silice (Silice-P *Flash Silica Gel*, Silicycle) avec l'éluant indiqué.

6.1.3 Analyses physico-chimiques

6.1.3.1 Généralités

Les pouvoirs rotatoires sont mesurés sur un polarimètre JASCO P-1010 et sont enregistrés à la température correspondante. Les points de fusion sont mesurés sur un appareil de type Fisher Jones et ne sont pas corrigés. Les lyophilisations sont effectuées sur un appareil Freeze Mobile 24 (Virtis). Les mesures de masse nominale sont réalisées sur un instrument LC-MSD et les mesures de masses exactes par spectrométrie de masse haute résolution sont réalisées sur un instrument LC-MSD-TOF (*liquid chromatography mass spectrometry time of flight*) modèle 6210 d'Agilent Technologies par Laboratoire « Plateforme analytique pour molécules organiques » de l'Université du Québec à Montréal. La source utilisée sur le MS-TOF est l'électrospray en mode positif. La source utilisée sur le MS-TOF est l'électrospray en mode positif avec la condition de la source (capillaire à 4000V pour le scan; température du gaz à 350°C; débit du gaz à 12 L/min; nébuliser à 35 PSI) et avec la condition du MS (fragmenteur à 100V; *skimmer* à 60V). Un volume de 1 μ L est injecté en utilisant une phase mobile d'ACN/H₂O 50% avec 0,1% d'acide formique.

6.1.3.2 Spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) proton (^1H) et carbone (^{13}C) sont enregistrés avec des appareils Varian-Gemini 2000 ou Varian-Innova AS600. Les spectres du ^1H sont enregistrés à une fréquence de 300 MHz ou 600 MHz et ceux du ^{13}C à 75 MHz ou 150 MHz.

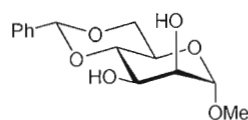
Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en partie par million (ppm) par rapport au tétraméthylsilane utilisé comme référence interne et en utilisant comme solvants ceux indiqués; les constantes de couplages (J) sont mesurées en Hz. La notation utilisée pour la description des spectres est la suivante: s (singulet), d (doublet), dd (doublet de doublet), t (triplet), q (quadruplet), qu (quintuplet), sex (sextuplet), m (multiplet), H_{arom} (protons aromatiques) et C_{arom} (carbones aromatiques).

Pour les composés libres, les échantillons sont analysés après lyophilisation dans D_2O 99,9 %. Les mesures sont effectuées dans l'eau lourde, $\geq 99,97\%$. La référence utilisée est alors le pic résiduel de l'eau pour les spectres de protons (étalonné par l'équation $\delta = 5,051 - 0,0111T$ où T correspond à la température au moment de l'acquisition en $^\circ\text{C}$, et l'acétone de qualité spectrale est utilisé pour les spectres du ^{13}C (référence interne: signal méthyle de l'acétone ajusté à $\delta = 29,8$ ppm).¹²⁹

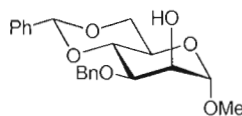
Pour les composés protégés et/ou solubles dans le chloroforme, la référence utilisée est alors le signal du CHCl_3 pour les spectres de protons (étalonné à $\delta = 7,27$ ppm quelque soit la température utilisée) ou la raie centrale du signal du CDCl_3 pour les spectres du ^{13}C (étalonné à $\delta = 77,0$ ppm). Les expériences bidimensionnelles homo- ou hétéronucléaires sont calibrées par analogie avec les spectres à une dimension correspondants.

¹²⁹ Gottlieb, H. E., Kotlyar, V., and Nudelman, A., *JOC*, **1997**, 62, 7512-7515 (1997)

6.2 MODES OPÉRATOIRES ET CARACTÉRISATION

4,6-*O*-Benzylidène- α -D-mannopyrannoside de méthyle (10)^{59,61}

Une quantité de α -D-mannopyrannoside de méthyle **9** (109 mg, 0,56 mmol) est dissoute dans un volume de DMF (5,6 mL) et refroidie à 0°C dans un bain de glace. Des quantités de pTsOH (11 mg, 0,06 mmol, 0,1 équiv.) et de Bn(OMe)₂ (0,09 mL, 0,58 mmol, 1,0 équiv.) sont ajoutées au mélange réactionnel. La réaction est suivie par CCM (MeOH/Tol 1:5) jusqu'à disparition complète du produit de départ (16h). Le produit brut résultant est concentré puis purifié sur colonne de silice (AcOEt/DCM 1:1) pour donner un solide blanc de 4,6-*O*-benzylidène- α -D-mannopyrannoside de méthyle **10** (150 mg, 95% rend.); $T_{\text{fus.}}$: 145-150°C, $R_f=0,47$ (AcOEt/DCM 1:1); $[\alpha]_D^{23} = +61$ ($c=1,0$, CHCl₃). **¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25°C):** $\delta = 7,51\text{--}7,46$ (m, 2H, H_{arom.}), 7,40-7,35 (m, 3H, H_{arom.}), 5,54 (s, 1H, PhCH), 4,69 (d, 1H, $J_{1-2} = 1,3$ Hz, H-1), 4,31-3,75 (m, 6H, H-2, 3, 4, 5, 6a, 6b), 3,37 (s, 3H, OCH₃) ppm. **¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25°C):** $\delta = 126,55\text{--}137,44$ (6 C_{arom.}), 102,46 (C-1), 101,59 (PhCH), 79,04 (C-5), 71,06 (C-2), 69,01 (C-3), 68,74 (C-4), 63,25 (C-6), 55,24 (OCH₃) ppm. **ESI-MS:** m/z calculé pour [C₁₄H₁₈O₆]⁺: 282,1103; trouvé: 282,1.

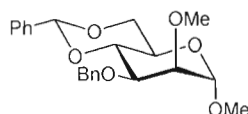
3-*O*-Benzyl-4,6-*O*-benzylidène- α -D-mannopyrannoside de méthyle (24)¹³⁰

Une quantité de 4,6-*O*-benzylidène- α -D-mannopyrannoside de méthyle **10** (1,14 g, 4,0 mmol) en plus d'une quantité de Bu₂SnO (1,11g, 4,5 mmol, 1,1 équiv.) sont dissoutes

¹³⁰ El Nemr, A., and Tsuchiya, T., *Carb. Res.*, **2001**, 330, 205-214

dans un volume de benzène (50 mL). Le tout est chauffé à reflux avec un montage de Dean-Stark pendant environ 2h pour être ensuite concentré, puis dilué avec un peu de DMF distillé (15 mL). Une quantité de BnBr (2,4 mL, 20,2 mmol, 5,0 équiv.) est ajoutée avant que le mélange réactionnel soit chauffé à 100°C avec suivi par CCM (AcOEt/EP 1:3) jusqu'à disparition complète du produit de départ (45 min). Le mélange réactionnel est filtré puis purifié sur colonne de silice (AcOEt/EP 1:3) pour donner une huile incolore de 3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidène- α -D-mannopyrannoside de méthyle **24** (1,42 g, 95% rend.); Rf=0,21 (AcOEt/EP 1:3); $[\alpha]_D^{23} = +51$ (c= 1.0, CHCl₃). **¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25°C):** δ = 7,54-7,36 (m, 10H, H_{arom.}), 5,64 (s, 1H, PhCH), 4,80 (dd, 2H, J_{1,2} = 11,9 Hz, J_{1,3} 31,6 Hz, PhCH₂), 4,77 (d, 1H, J_{1,2} = 1,4 Hz, H-1), 4,33-3,79 (m, 5H, H-2, 3, 4, 6a, 6b), 3,39 (s, 3H, OCH₃), 2,85 (s, 1H, H-5) ppm. **¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25°C):** δ = 137,79-126,30 (12C_{arom.}), 101,83 (C-1), 101,32 (PhCH), 79,06 (C-5), 75,83 (C-2), 73,25 (C-3), 70,08 (PhCH₂), 69,12 (C-4), 63,43 (C-6), 55,19 (OCH₃) ppm. **ESI-MS:** m/z calculé pour [C₂₁H₂₄O₆+H]⁺: 373,1651; trouvé: 373,2.

3-*O*-Benzyl-4,6-*O*-benzylidène-2-*O*-méthyl- α -D-mannopyrannoside de méthyle (**26**)¹³¹

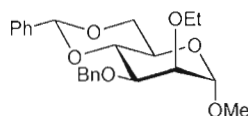


Une quantité de 3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidène- α -D-mannopyrannoside de méthyle **24** (49 mg, 0,1 mmol) est dissoute dans un volume de DMF distillé (1 mL). Parallèlement, est dissous un large excès de NaH propre (87 mg, 2,2 mmol, 5,0 équiv.) dans le même volume de DMF distillé (1 mL). Le ballon contenant le produit de départ est mis sur bain de glace, puis la solution de NaH est transférée dans le mélange réactionnel à l'aide d'une canule. Le tout est fait sous une atmosphère inerte d'azote et est laissé revenir à température ambiante avant d'ajouter une quantité de MeI (18 μ L, 0,3 mmol, 3,0 équiv.). La réaction est ensuite suivie par CCM (AcOEt/Hex 1:4) jusqu'à disparition complète du produit de départ (1h). Le mélange réactionnel est neutralisé avec un volume de MeOH (1 mL) pour ensuite être

¹³¹ Nashed, M., *Carb. Res.*, **1978**, 60, 200-205

extraite au CHCl_3 , lavée au NaCl sat. et séchée au Na_2SO_4 . Le produit brut résultant est purifié sur colonne de silice (AcOEt/Hex 1:4) pour donner une huile incolore de 3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidène-2-*O*-méthyl- α -D-mannopyrannoside de méthyle **26** (192 mg, 85% rend.); $R_f=0,27$ (AcOEt/Hex 1:4); $[\alpha]_D^{23}=+65$ ($c=1.0$, CHCl_3). **^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , 25°C):** $\delta = 7,47\text{--}7,31$ (m, 10H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 5,57 (s, 1H, PhCH), 4,82 (dd, 2H, $J_{1-2}=12,3$ Hz, $J_{1-3}=47,3$ Hz, PhCH_2), 4,77 (d, 1H, $J_{1-2}=1,5$ Hz, H-1), 4,31-3,78 (m, 6H, H-2, 3, 4, 5, 6a, 6b), 3,51 (s, 3H, 2- OCH_3), 3,31 (s, 3H, 1- OCH_3) ppm. **^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , 25°C):** $\delta = 137,93\text{--}126,29$ ($12\text{C}_{\text{arom.}}$), 101,73 (C-1), 100,13 (PhCH), 79,72 (PhCH_2), 79,36 (C-5), 76,36 (C-2), 73,37 (C-3), 69,09 (C-4), 64,20 (C-6), 60,38 (2- OCH_3), 55,11 (1- OCH_3) ppm. **ESI-MS:** m/z calculé pour $[\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_6+\text{H}]^+$: 387,1807; trouvé: 387,2.

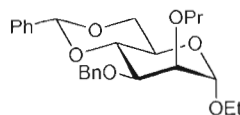
3-*O*-Benzyl-4,6-*O*-benzylidène-2-*O*-éthyl- α -D-mannopyrannoside de méthyle (**27**)¹³¹



Une quantité de 3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidène- α -D-mannopyrannoside de méthyle **24** (56 mg, 0,2 mmol) ainsi qu'une quantité catalytique de TBAI (7 mg, 0,02 mmol, 0,1 équiv.) sont dissoutes dans un volume de DMF distillé (1 mL). Parallèlement, est dissous un large excès de NaH propre (40 mg, 1,0 mmol, 5,0 équiv.) dans le même volume de DMF distillé (1 mL). Le ballon contenant le produit de départ est mis sur bain de glace, puis la solution de NaH est transférée dans à l'aide d'une canule. Le tout est fait sous une atmosphère inerte d'azote et est laissé revenir à température ambiante avant d'ajouter une quantité de EtBr (25 μL , 0,3 mmol). La réaction est ensuite suivie par CCM (AcOEt/Hex 1:6) jusqu'à disparition complète du produit de départ (1h). Le mélange réactionnel est neutralisé avec un volume de MeOH (1 mL) pour ensuite être extraite au CHCl_3 , lavée au NaCl sat. et séchée au Na_2SO_4 . Le produit brut résultant a été purifié sur colonne de silice (AcOEt/Hex 1:6) pour donner une huile incolore de 3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidène-2-*O*-éthyl- α -D-mannopyrannoside de méthyle **27** (49 mg, 82% rend.); $R_f=0,30$ (AcOEt/Hex 1:6). **^1H NMR**

(300 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 7,47-7,30 (m, 10H, H_{arom.}), 5,58 (s, 1H, Ph-CH), 4,81 (dd, 2H, J₁₋₂ = 12,3 Hz, J₁₋₃ 44,4 Hz, PhCH₂), 4,74 (d, 1H, J₁₋₂ = 1,4 Hz, H-1) 4,23-3,61 (m, 8H, H-2, 3, 4, 5, 6a, 6b, 2-OCH₂CH₃), 3,30 (s, 3H, 1-OCH₃), 1,26 (t, 3H, J₁₋₂ = 7,0 Hz, 2-OCH₂CH₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 137,97-126,31 (12C_{arom.}), 101,69 (C-1), 100,98 (Ph-CH), 79,27 (PhCH₂), 76,87 (C-5), 76,37 (C-2), 73,19 (C-3), 69,11 (C-4), 68,06 (2-OCH₂CH₃), 64,25 (C-6), 55,07 (1-OCH₃), 15,83 (2-OCH₂CH₃) ppm. ESI-MS: m/z calculé pour [C₂₃H₂₈O₆+H]⁺: 401,1964; trouvé: 401,2.

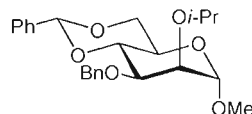
3-O-Benzyl-4,6-O-benzylidène-2-O-propyl- α -D-mannopyrannoside de méthyle (28)



Une quantité de 3-O-benzyl-4,6-O-benzylidène- α -D-mannopyrannoside de méthyle **24** (57 mg, 0,2 mmol) ainsi qu'une quantité catalytique de TBAI (9 mg, 0,02 mmol, 0,1 équiv.) sont dissoutes dans un volume de DMF distillé (1 mL). Parallèlement, est dissous un large excès de NaH propre (40 mg, 1,0 mmol, 5,0 équiv.) dans le même volume de DMF distillé (1 mL). Le ballon contenant le produit de départ est mis sur bain de glace, puis la solution de NaH est transférée dans à l'aide d'une canule. Le tout est fait sous une atmosphère inerte d'azote et est laissé revenir à température ambiante avant d'ajouter une quantité de PrBr (30 μ L, 0,3 mmol, 1,5 équiv.). La réaction est ensuite suivie par CCM (AcOEt/Hex 1:6) jusqu'à disparition complète du produit de départ (1h). Le mélange réactionnel est neutralisé avec un volume de MeOH (1 mL) pour ensuite être extraite au CHCl₃, lavée au NaCl sat. et séchée au Na₂SO₄. Le produit brut résultant a été purifié sur colonne de silice (AcOEt/Hex 1:6) pour donner une huile incolore de 3-O-benzyl-4,6-O-benzylidène-2-O-propyl- α -D-mannopyrannoside de méthyle **28** (50 mg, 81% rend.); R_f=0,43 (AcOEt/Hex 1:6). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 7,55-7,29 (m, 10H, H_{arom.}), 5,66 (s, 1H, PhCH), 4,81 (dd, 2H, J₁₋₂ = 12,3 Hz, J₁₋₃ 42,4 Hz, PhCH₂), 4,76 (1H, J₁₋₂ = 1,5 Hz, H-1) 4,31-3,55 (m, 8H, H-2, 3, 4, 5, 6a, 6b, 2-OCH₂CH₂CH₃), 3,38 (s, 3H, 1-OCH₃), 1,66-1,54

(sex, 2H, $J_{1-2} = 7,4$ Hz, $J_{1-3} = 14,3$ Hz, $J_{1-4} = 21,6$ Hz, 2-OCH₂CH₂CH₃), 0,97 (t, 3H, $J_{1-2} = 7,3$ Hz, OCH₂CH₂CH₃) ppm. **¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25°C):** $\delta = 137,97$ -126,30 (12C_{arom.}), 101,66 (C-1), 100,79 (PhCH), 79,23 (PhCH₂), 77,83 (OCH₂CH₂CH₃), 76,42 (C-5), 74,34 (C-2), 73,04 (C-3), 69,10 (C-4), 64,25 (C-6), 55,03 (1-OCH₃), 23,42 (2-OCH₂CH₂CH₃), 10,74 (2-OCH₂CH₂CH₃) ppm. **ESI-MS:** m/z calculé pour [C₂₄H₃₀O₆+H]⁺: 415,2121; trouvé: 414,9.

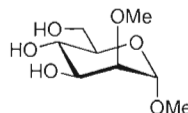
3-*O*-Benzyl-4,6-*O*-benzylidène-2-*O*-isopropyl- α -D-mannopyrannoside de méthyle (29)



Une quantité de 3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidène- α -D-mannopyrannoside de méthyle **24** (56 mg, 0,15 mmol) ainsi qu'une quantité catalytique de TBAI (8 mg, 0,02 mmol, 0,1 équiv.) sont dissoutes dans un volume de DMF distillé (2 mL). Parallèlement, est dissous un large excès de NaH propre (30 mg, 0,75 mmol, 5,0 équiv.) dans le même volume de DMF distillé (1 mL). Le ballon contenant le produit de départ est mis sur bain de glace, puis la solution de NaH est transférée dans à l'aide d'une canule. Le tout est fait sous une atmosphère inerte d'azote. Le mélange réactionnel est laissé revenir à température ambiante avant d'ajouter une quantité de *i*-PrBr (30 μ L, 0,33 mmol, 2,2 équiv.). La réaction est ensuite suivie par CCM (AcOEt/Hex 1:6) jusqu'à disparition complète du produit de départ (1h). La réaction est neutralisée avec un volume de MeOH (1 mL) pour ensuite être extraite au CHCl₃, lavée au NaCl sat. et séchée au Na₂SO₄. Le produit brut résultant est purifié sur colonne de silice (MeOH/AcOEt 1:6) pour donner une huile incolore de 2-*O*-propyl-3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidène- α -D-mannopyrannoside de méthyle **25** (4 mg, 7% rend.); $R_f=0,37$ (MeOH/AcOEt 1:6); $[\alpha]_D^{23} = +1$ ($c = 1,0$, CHCl₃). **¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25°C):** $\delta = 7,52$ -7,28 (m, 10H, H_{arom.}), 5,64 (s, 1H, PhCH), 4,79 (dd, 2H, $J_{1-2} = 12,4$ Hz, $J_{1-3} = 41,8$ Hz, PhCH₂), 4,66 (1H, $J_{1-2} = 1,4$ Hz, H-1), 4,28-3,72 (m, 7H, H-2, 3, 4, 5, 6a, 6b, 2-OCH(CH₃)₂), 3,36 (s, 3H, 1-OCH₃), 1,23 (dq, 6H, $J_{1-2} = 6,1$ Hz, $J_{1-3} = 20,2$ Hz, 2-OCH(CH₃)₂) ppm. **¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25°C):** $\delta = 99,89$ (C-1), 81,03 (C-5), 77,06 (2-OCH(CH₃)₂), 71,78

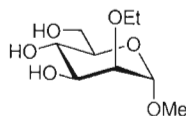
(C-2) , 71,43 (C-3), 69,22 (C-4) , 62,70 (C-6) , 55,08 (OCH₃), 22,28-23,24 (2-OCH(CH₃)₂) ppm. **ESI-MS**: m/z calculé pour [C₂₄H₃₀O₆+Na]⁺: 437,1940; trouvé: 437,5.

2-*O*-Méthyl- α -D-mannopyrannoside de méthyle (33)



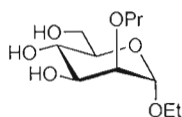
Une quantité de 3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidène-2-*O*-méthyl- α -D-mannopyrannoside de méthyle **25** (514 mg, 1,33 mmol) ainsi qu'une quantité catalytique de palladium sur charbon activé 10% m/m (50 mg) ont été dissoutes dans un volume de MeOH (2 mL) et une goutte de HCl 1M sec. Le mélange réactionnel a été purgé à l'azote sec avant d'être saturé avec de l'hydrogène. La réaction est ensuite suivie par CCM (MeOH/AcOEt 1:9) jusqu'à disparition complète du produit de départ (2h). Le produit brut résultant a été purifié sur colonne de silice (MeOH/AcOEt 1:9) pour donner une huile incolore de 3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidène-2-*O*-propyl- α -D-mannopyrannoside de méthyle **33** (252 mg, 91% rend.); R_f=0,27 (MeOH/AcOEt 1:9); [α]_D²³ = +51 (c= 1.0, MeOH). **¹H NMR (300 MHz, D₂O, 25°C)**: δ = 4,90 (s, 1H, H-1), 3,88-3,84 (d, 2H, J₁₋₂= 1,9 Hz, H-6a, H-6b), 3,78-3,75 (m, 1H, H-5), 3,71-3,65 (m, 1H, H-4), 3,43 (s, 3H, 2-O-CH₃), 3,38 (s, 3H, 1-O-CH₃) ppm. **¹³C NMR (75 MHz, D₂O + acétone, 25°C)**: δ = 97,30 (C-1), 79,81 (C-5), 72,40 (C-2), 70,24 (C-3), 67,10 (C-4), 60,92 (C-6), 58,81 (2-OCH₃), 54,76 (1-OCH₃) ppm. **ESI-MS**: m/z calculé pour [C₈H₁₆O₆+H]⁺: 209.1025; trouvé: 209,1.

2-*O*-Éthyl- α -D-mannopyrannoside de méthyle (34)



Une quantité de 3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidène-2-*O*-éthyl- α -D-mannopyrannoside de méthyle **25** (242 mg, 0,60 mmol) ainsi qu'une quantité catalytique de palladium sur charbon activé 10% m/m (24 mg) ont été dissoutes dans un volume de MeOH (2 mL) et une goutte de HCl 1M sec. Le mélange réactionnel a été purgé à l'azote sec avant d'être saturé avec de l'hydrogène. La réaction est ensuite suivie par CCM (MeOH/AcOEt 1:33) jusqu'à disparition complète du produit de départ (2h). Le produit brut résultant a été purifié sur colonne de silice (MeOH/AcOEt 1:33) pour donner une huile incolore de 3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidène-2-*O*-éthyl- α -D-mannopyrannoside de méthyle **34** (114 mg, 85% rend.); $R_f=0,24$ (MeOH/AcOEt 1:33); $[\alpha]_D^{23} = +0$ (c= 1.0, MeOH). **¹H NMR (300 MHz, D₂O, 25°C):** δ = 4,78 (s, 1H, H-1), 3,90-3,47 (m, 8H, H-2, 3, 4, 5, 6a, 6b, 2-OCH₂CH₃), 3,32 (s, 3H, 1-OCH₃), 1,10 (t, 3H, J = 7,5 Hz, 2-OCH₂CH₃) ppm. **¹³C NMR (75 MHz, D₂O + acétone, 25°C):** δ = 98,99 (C-1), 78,58 (C-5), 72,07 (C-2), 71,54 (C-3), 67,15 (C-4), 62,48 (C-6), 55,09 (2-OCH₂CH₃), 54,60 (1-OCH₃), 15,53 (2-OCH₂CH₃) ppm. **ESI-MS:** m/z calculé pour [C₉H₁₈O₆+H]⁺: 223,1182; trouvé: 223,1.

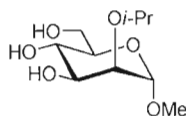
2-*O*-Propyl- α -D-mannopyrannoside de méthyle (**35**)



Une quantité de 3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidène-2-*O*-propyl- α -D-mannopyrannoside de méthyle **25** (50 mg, 0,12 mmol) ainsi qu'une quantité catalytique de palladium sur charbon activé 10% m/m (5 mg) ont été dissoutes dans un volume de MeOH (2 mL) et une goutte de HCl 1M sec. Le mélange réactionnel a été purgé à l'azote sec avant d'être saturé avec de l'hydrogène. La réaction est ensuite suivie par CCM (MeOH/AcOEt 1:33) jusqu'à disparition complète du produit de départ (2h). Le produit brut résultant a été purifié sur colonne de silice (MeOH/AcOEt 1:33) pour donner une huile incolore de 3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidène-2-*O*-propyl- α -D-mannopyrannoside de méthyle **35** (22 mg, 77% rend.); $R_f=0,29$ (MeOH/AcOEt 1:33); $[\alpha]_D^{23} = -3$ (c= 1.0, MeOH). **¹H NMR (300 MHz, D₂O, 25°C):** δ =

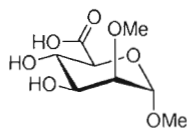
4,82 (s, 1H, H-1), 3,90-3,48 (m, 8H, H-2, 3, 4, 5, 6a, 6b, 2-OCH₂CH₂CH₃), 3,33 (s, 3H, 1-OCH₃), 1,52 (sex, 2H, $J_{1-2} = 7,1$ Hz 2-OCH₂CH₂CH₃), 0,82 (t, $J_{1-2} = 7,3$ Hz, 3H, 2-OCH₂CH₂CH₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, D₂O + acétone, 25°C): $\delta = 98,72$ (C-1), 78,31 (C-5), 73,95 (2-OCH₂CH₂CH₃), 72,55 (C-2), 70,58 (C-3), 67,18 (C-4), 61,02 (C-6), 54,77 (1-OCH₃), 22,36 (2-OCH₂CH₂CH₃), 9,65 (2-OCH₂CH₂CH₃) ppm. ESI-MS: m/z calculé pour [C₁₀H₂₀O₆+H]⁺: 237,1338; trouvé: 237,1.

2-*O*-Isopropyl- α -D-mannopyrannoside de méthyle (36)



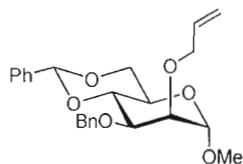
Une quantité de 3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidène-2-*O*-isopropyl- α -D-mannopyrannoside de méthyle **25** (11 mg, 0,03 mmol) ainsi qu'une quantité catalytique de palladium sur charbon activé 10% m/m (1 mg) ont été dissoutes dans un volume de MeOH (1 mL) et une goutte de HCl 1M sec. Le mélange réactionnel a été purgé à l'azote sec avant d'être saturé avec de l'hydrogène sec. La réaction est ensuite suivie par CCM (MeOH/AcOEt 1:33) jusqu'à disparition complète du produit de départ (2h). Le produit brut résultant est purifié sur colonne de silice (MeOH/AcOEt 1:33) pour donner une huile jaunâtre de 2-*O*-propyl-3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidène- α -D-mannopyrannoside de méthyle **36** (4 mg, 38% rend.); $R_f=0,23$ (MeOH/AcOEt 1:33); $[\alpha]_D^{23} = +1$ ($c = 1,0$, MeOH). ¹H NMR (300 MHz, D₂O, 25°C): $\delta = 4,64$ (s, 1H, H-1), 3,49-3,80 (m, 7H, H-2, 3, 4, 5, 6a, 6b, 2-OCH(CH₃)₂), 3,31 (s, 3H, 1-OCH₃), 1,14 (dq, 6H, $J_{1-2} = 6,1$ Hz, $J_{1-3} = 20,2$ Hz, 2-OCH(CH₃)₂) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, D₂O + acétone, 25°C): $\delta = 99,89$ (C-1), 81,03 (C-5), 77,05 (C-2), 71,78 (C-3), 71,43 (C-4), 69,22 (C-3), 62,70 (C-6), 55,08 (1-OCH₃), 22,76 (2-OCH(CH₃)₂) ppm. ESI-MS: m/z calculé pour [C₁₀H₂₀O₆+Na]⁺: 259,1158; trouvé: 259,1.

Acide 2-*O*-méthyl- α -D-mannopyrannosiduronique de méthyle (37)



Une quantité de 3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidène-2-*O*-propyl- α -D-mannopyrannoside de méthyle **33** (114 mg, 0,55 mmol) est dissoute dans un mélange de DCM/H₂O 3:1 (4 mL). La solution est agitée au maximum avant l'ajout d'une quantité de TEMPO (26 mg, 0,17 mmol, 0,3 équiv.) et d'une quantité de BAIB (1,08 g, 3,35 mmol, 6,1 équiv.). La réaction est ensuite suivie par CCM (AcOEt/MeOH/H₂O 7:3:1) jusqu'à disparition complète du produit de départ (30 min). Le produit brut résultant est concentré puis purifié sur colonne de silice AcOEt/MeOH/H₂O 7:3:1) pour donner un solide blanc de 2-*O*-méthyl- α -D-mannopyrannosiduronique de méthyle **37** (98 mg, 60% rend.); R_f=0,22 (AcOEt/MeOH/H₂O 7:3:1). ¹H NMR (300 MHz, D₂O, 25°C): δ = 11,03 (s, 1H, 6-COOH), 5,28 (s, 1H, H-1), 4,53 (s, 1H, H-5), 3,88-3,84(m, 5H, H-2, 3, 4, 6a, 6b), 3,49 (s, 3H, 2-O-CH₃), 3,31 (s, 3H, 1-O-CH₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, D₂O + acétone, 25°C): δ = 173,11 (C-6), 105,19 (C-1), 87,72 (C-2), 80,75 (C-5), 76,27 (C-3), 73,03 (C-4), 57,71 (2-OCH₃), 55,80 (1-OCH₃) ppm. ESI-MS: m/z calculé pour [C₈H₁₄O₇+Na]⁺: 245,0637; trouvé: 245,1.

3-*O*-Benzyl-4,6-*O*-benzylidène-2-*O*-allyl- α -D-mannopyrannoside de méthyle (**38**)¹³²

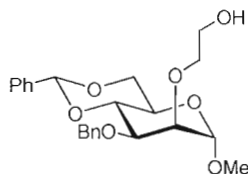


Une quantité de 3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidène- α -D-mannopyrannoside de méthyle **24** (644 mg, 1,73 mmol) est dissoute dans un volume de DMF (5 mL). La solution est ensuite refroidie à 0°C dans un bain de glace, puis une quantité de NaH 60% est ajoutée (152 mg, 3,8 mmol, 2,4 équiv.) et laissée agiter à t.p. jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de dégagement d'hydrogène gazeux (30 min). Ensuite, des quantités de TBAI (64 mg, 0,17 mmol, 0,1 équiv.)

¹³² Grzeszczyk, B., Holst, O., Müller-Loennies, S., and Zamojski, A., *Carb. Res.*, **1998**, 307, 55-67

et d'AllBr (0,18 mL, 2,0 mmol, 1,2 équiv.) sont ajoutées au mélange réactionnel. La réaction est suivie par CCM (AcOEt/Hex 1:9) jusqu'à disparition complète du produit de départ (16h). Le produit brut résultant est concentré puis purifié sur colonne de silice (AcOEt/Hex 1:9) pour donner une huile incolore de 3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidène-2-*O*-allyl- α -D-mannopyrannoside de méthyle **38** (397 mg, 56% rend.); Rf=0,19 (AcOEt/Hex 1:9); $[\alpha]_D^{23} = +51$ (c = 1,0, CHCl₃). **¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25°C):** δ = 7,54-7,29 (m, 10H, H_{arom.}), 5,97 (m, 1H, 2-OCH₂CH=CH₂), 5,65 (s, 1H, PhCH), 5,29 (m, 8H, H-2, 3, 4, 5, 6a, 6b, 2-OCH₂CH=CH₂), 4,81 (dd, 2H, J_{1,2} = 12,3 Hz, J_{1,3} 43,9 Hz, PhCH₂), 4,73 (d, 1H, J_{1,2} = 1,3 Hz, H-1), 4,35-3,75 (m, 1H, 2-OCH₂CH=CH₂), 3,38 (s, 3H, 1-OCH₃) ppm. **¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25°C):** δ = 138,63-126,00 (12C_{arom.}), 134,81 (2-OCH₂CH=CH₂), 117,69 (2-OCH₂CH=CH₂), 101,41 (PhCH), 100,62 (C-1), 79,07 (C-5), 77,42 (C-2), 76,11 (C-3), 73,02 (PhCH₂), 68,82 (C-4), 63,95 (C-6), 54,78 (OCH₃) ppm. **ESI-MS:** m/z calculé pour [C₂₄H₂₈O₆+H]⁺: 413,1964; trouvé: 413,2.

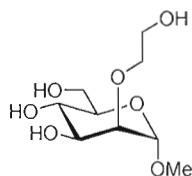
3-*O*-Benzyl-4,6-*O*-benzylidène-2-*O*-hydroxyéthyl- α -D-mannopyrannoside de méthyle (40**)⁵⁷**



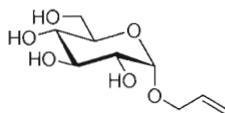
Une quantité de 3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidène-2-*O*-allyl- α -D-mannopyrannoside de méthyle **38** (260 mg, 0,63 mmol) est dissoute dans un mélange MeOH/DCM 1:1 (17 mL) et refroidie à -78°C dans un bain d'acétone-glace sèche. Le mélange réactionnel est d'abord purgé en faisant barboter de l'oxygène puis de l'ozone est barboté. La réaction est suivie par CCM (AcOEt/Hex 1:4) jusqu'à disparition complète du produit de départ (2 min). Le mélange réactionnel est laissé réchauffé à t.p. puis une quantité de NaBH₄ (97 mg, 2,6 mmol, 4,0 équiv.) est ajoutée. La réaction est suivie par CCM (AcOEt/Hex 4:1) jusqu'à disparition complète du produit de départ (16h). Le produit brut résultant est concentré puis purifié sur colonne de silice (AcOEt/Hex 4:1) pour donner une huile incolore de 3-*O*-benzyl-4,6-*O*-

benzylidène-2-*O*-hydroxyéthyl- α -D-mannopyrannoside de méthyle **40** (236 mg, 90% rend.); $R_f=0,46$ (AcOEt/Hex 4:1). **^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , 25°C):** δ = 7,57-7,30 (m, 10H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 5,66 (s, 1H, PhCH), 4,84 (dd, 2H, $J_{1-2} = 11,9$ Hz, $J_{1-3} = 51,9$ Hz, PhCH_2), 4,73 (s, 1H, H-1), 4,31-3,61 (m, 10H, H-2, 3, 4, 5, 6a, 6b, 2- $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 3,37 (s, 3H, 1- OCH_3) ppm. **^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , 25°C):** δ = 137,80-125,96 (m, 10H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 101,43 (C-1), 100,22 (PhCH), 79,38 (C-5), 78,74 (C-2), 75,55 (C-3), 73,76 (2- $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 73,60 (PhCH_2), 68,72 (C-4), 63,68 (C-6), 61,46 (2- $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 54,79 (OCH_3) ppm. **ESI-MS:** m/z calculé pour $[\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_7+\text{H}]^+$: 417,1913; trouvé: 417,2.

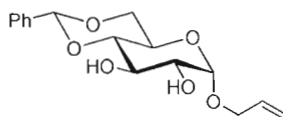
2-*O*-Hydroxyéthyl- α -D-mannopyrannoside de méthyle (**41**)⁵⁷



Une quantité de 3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidène-2-*O*-hydroxyéthyl- α -D-mannopyrannoside de méthyle **40** (236 mg, 0,57 mmol) est dissoute dans un volume de MeOH (5,7 mL). Une quantité catalytique de HCl sec préalablement formé *in situ* (AcCl/MeOH 1:24) est ajouté au mélange (2,3 mL, 0,06 mmol, 0,1 équiv.). Le mélange réactionnel est d'abord purgé en faisant barboter de l'azote puis une pression d'hydrogène est exercée au-dessus du liquide. La réaction est suivie par CCM (MeOH/AcOEt 1:9) jusqu'à disparition complète du produit de départ (16h). Le produit brut résultant est filtré sur terre de diatomée, concentré puis purifié sur colonne de silice (MeOH/AcOEt 1:9) pour donner un solide blanc de 2-*O*-hydroxyéthyl- α -D-mannopyrannoside de méthyle **41** (116 mg, 82% rend.); T_{fus} : 156-159°C; $R_f=0,19$ (MeOH/AcOEt 1:9); $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +18$ ($c = 1,0$, MeOH). **^1H NMR (300 MHz, D_2O , 25°C):** δ = 4,75 (s, 1H, H-1), 3,89-3,47 (m, 8H, H-2, 3, 4, 5, 6a, 6b, 2- $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 3,34 (s, 3H, 1- OCH_3), 1,23 (m, 2H, 2- $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) ppm. **^{13}C NMR (75 MHz, D_2O + acétone, 25°C):** δ = 98,72 (C-1), 79,16 (C-5), 78,74 (C-2), 72,67 (C-3), 72,11 (2- $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 71,31 (C-4), 67,14 (C-6), 61,33 (2- $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 54,95 (OCH_3) ppm. **ESI-MS:** m/z calculé pour $[\text{C}_9\text{H}_{18}\text{O}_7+\text{Na}]^+$: 261,0650; trouvé: 261,1.

α -D-Glucopyrannoside d'allyle (42)^{133,134,135}

Une quantité de D-glucose **48** (15,2 g, 84,4 mmol) est dissoute dans un volume d'alcool allylique (100 mL). Une quantité catalytique de *p*TsOH (1,6 g, 8,4 mmol, 0,1 équiv.) est ajoutée puis le mélange réactionnel chauffé à 50°C. La réaction est suivie par CCM (AcOEt/Hex 1:1) jusqu'à disparition complète du produit de départ (3h). Le produit brut résultant est concentré puis purifié sur colonne de silice (AcOEt/Hex 1:1) pour donner un solide blanc d' α -D-glucopyrannoside d'allyle **42** (18,6 g, 99% rend.); T_{fus} : 98-99°C; R_f =0,36 (AcOEt/Hex 1:1); $[\alpha]_D^{23} = +140$ ($c = 1.0$, MeOH). **^1H NMR (300 MHz, D_2O , 25°C):** $\delta = 5,99$ (m, 1H, 1-OCH₂CH=CH₂), 5,33 (dd, 2H, $J_{1-2} 1,2 = \text{Hz}$, $J_{1-3} = 17 \text{ Hz}$, 1-OCH₂CH=CH₂), 4,97 (d, 1H, $J_{1-2} = 3,8 \text{ Hz}$, H-1), 4,27-3,41 (m, 8H, H-2, 3, 4, 5, 6a, 6b, 1-OCH₂CH=CH₂) ppm. **^{13}C NMR (75 MHz, D_2O + acétone, 25°C):** $\delta = 132,17$ (1-OCH₂CH=CH₂), 116,59 (1-OCH₂CH=CH₂), 95,71 (C-1), 71,56 (C-5), 70,20 (C-3), 69,63 (C-2), 68,01 (C-4), 66,80 (1-OCH₂CH=CH₂), 59,04 (C-6) ppm. **ESI-MS:** m/z calculé pour $[\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_6 + \text{Na}]^+$: 243,0845; trouvé: 243,1.

4,6-*O*-Benzylidène- α -D-glucopyrannoside d'allyle (49)^{134,135,136}

¹³³ Holme, K. R., and Hallf, L. D., *Carb. Res.*, **1992**, 225, 291-306

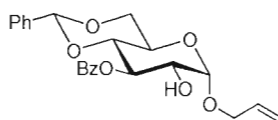
¹³⁴ Turský, M., Veselý, J., Tišlerová, I., Trnka, T., and Ledvina, M., *Synthesis*, **2008**, 16, 2610-2616

¹³⁵ Mehta, S., Jordan, K. L., Weimar, T., Kreis, U. C., Batchelor, R. J., Einstein, F. W. B., and Pinto, B. M., *Tetrahedron Asym.*, **1994**, 5, 2367-2396

¹³⁶ Tanaka, H., Kawai, K., Fujiwara, K., and Murai A., *Tetrahedron*, **2002**, 58, 10017-10031

Une quantité d' α -D-glucopyrannoside d'allyle **42** (18,7 mg, 84,2 mmol) est dissoute dans un volume d'ACN (100 mL). Des quantités de *p*TsOH (1,4 g, 8,1 mmol, 0,1 équiv.) et de Bn(OMe)₂ (26 mL, 173 mmol, 2,0 équiv.) sont ajoutées puis le mélange réactionnel est chauffé à 50°C. La réaction est suivie par CCM (AcOEt/Hex 6,5:3,5) jusqu'à disparition complète du produit de départ (16h). Le produit brut résultant est concentré puis purifié sur colonne de silice (AcOEt/Hex 6,5:3,5) pour donner un solide blanc de 4,6-*O*-benzylidène- α -D-glucopyrannoside d'allyle **49** (25,2 g, 84% rend.); T_{fus} : 135-137°C; R_f =0,22 (AcOEt/Hex 6,5:3,5); $[\alpha]_D^{23}$ = +109 (c = 1,0, CHCl₃). **¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25°C):** δ = 7,57-7,28 (m, 5H, H_{arom.}), 5,95 (m, 1H, 1-OCH₂CH=CH₂), 5,57 (s, 1H, PhCH), 5,32 (dd, 2H, J₁₋₂ 1,2 = Hz, J₁₋₃ = 17,4 Hz, 1-OCH₂CH=CH₂), 4,99 (s, 1H, H-1), 4,37-3,43 (m, 8H, H-2, 3, 4, 5, 6a, 6b, 1-OCH₂CH=CH₂) ppm. **¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25°C):** δ = 137,30-126,34 (6C, C_{arom.}), 134,13 (1-OCH₂CH=CH₂), 117,62 (1-OCH₂CH=CH₂), 109,23 (C-1), 98,16 (PhCH), 83,43 (C-5), 74,26 (C-3), 70,84 (C-2), 70,29 (C-4), 68,87 (1-OCH₂CH=CH₂), 66,32 (C-6) ppm. **ESI-MS:** m/z calculé pour [C₁₆H₂₀O₆+H]⁺: 309.1338; trouvé: 309,1.

3-*O*-Benzoyl-4,6-*O*-benzylidène- α -D-glucopyrannoside d'allyle (**50**)^{135,137}

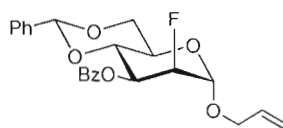


Une quantité de 4,6-*O*-benzylidène- α -D-glucopyrannoside d'allyle **49** (506 mg, 1,6 mmol) est dissoute dans un volume de THF (16 mL). La solution est ensuite refroidie à 0°C dans un bain de glace, puis une quantité de NaH 60% est ajoutée (152 mg, 3,8 mmol, 2,4 équiv.) et laissée agiter à t.p. jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de dégagement d'hydrogène gazeux (30 min). Ensuite, une quantité de CuCl₂ (245 mg, 1,8 mmol, 1,1 équiv.) est ajoutée puis laissée agiter à t.p. jusqu'à ce que la solution devienne vert limpide (30 min). Puis un volume de BzCl (0,21 mL, 1,8 mmol, 1,1 équiv.) est ajouté puis laissé agiter à température pièce. La réaction est suivie par CCM (AcOEt/Hex 3,5:7,5) jusqu'à disparition complète du produit de

¹³⁷ Ness, K. A., and Migaud, M. E., *Beilstein JOC*, 2007, 3, pas de numéro de page précisé

départ (16h). Le produit brut résultant est extrait à l'AcOEt, lavé à l'EDTA et au NaCl sat., concentré puis purifié sur colonne de silice (AcOEt/Hex 3:7) pour donner un solide blanc de 3-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidène- α -D-glucopyrannoside d'allyle **50** (413 mg, 61% rend.); $T_{\text{fus.}}$: 176°C; $R_f=0,41$ (AcOEt/Hex 3:7); $[\alpha]_D^{23} = +55$ ($c = 1,0$, CHCl_3). **^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , 25°C):** $\delta = 7,54\text{--}7,29$ (m, 10H, $H_{\text{arom.}}$), 5,96 (m, 1H, 1- $\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 5,60 (s, 1H, PhCH), 5,30 (dd, 2H, $J_{1,2} 1,3 = \text{Hz}$, $J_{1,3} = 18,5 \text{ Hz}$, 1- $\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 4,97 (s, 1H, H-1), 4,34-3,61 (m, 8H, H-2, 3, 4, 5, 6a, 6b, 1- $\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$) ppm. **^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , 25°C):** $\delta = 138,43\text{--}125,95$ (12C, $C_{\text{arom.}}$), 133,32 (1- $\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 118,24 (1- $\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 101,18 (C-1), 97,92 (PhCH), 81,86 (C-5), 78,95 (C-3), 74,79 (C-2), 72,33 (C-4), 66,89 (1- $\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 62,73 (C-6) ppm. **ESI-MS:** m/z calculé pour $[\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_7]^+$: 412,1522; trouvé: 412,2

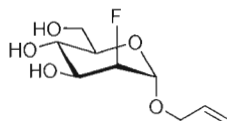
3-*O*-Benzoyl-4,6-*O*-benzylidène-2-désoxy-2-fluoro- α -D-mannopyrannoside d'allyle (**51**)



Une quantité de 3-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidène- α -D-glucopyrannoside d'allyle **50** (119 mg, 0,29 mmol) est dissoute dans un volume de DCM (3 mL) à -78°C dans un bain d'acétone-glace sèche. Une quantité de DAST (0,04 mL, 0,30 mmol, 1,1 équiv.) est ajoutée puis le tout est laissé agiter à température pièce. La réaction est suivie par CCM (AcOEt/Hex 1:9) jusqu'à disparition complète du produit de départ (20 min). Une quantité de MeOH est ajoutée (0,2 mL) au mélange réactionnel pour neutraliser le DAST puis laissé agiter toute une nuit (16h). Le mélange réactionnel est concentré, dilué à l'AcOEt, lavé au NaHCO_3 sat., lavé au NaCl sat., séché au Na_2SO_4 , évaporé puis purifié sur colonne de silice (AcOEt/Hex 1:9) pour donner une solide blanc de 3-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidène-2-désoxy-2-fluoro- α -D-mannopyrannoside d'allyle **51** (18 mg, 20% rend.); $R_f=0,40$ (AcOEt/Hex 1:9). **^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , 25°C):** $\delta = 7,64\text{--}7,38$ (m, 10H, $H_{\text{arom.}}$), 5,94 (m, 1H, 1- $\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 5,67 (s, 1H, PhCH), 5,32 (ddd, 2H, $J_{1,2} 1,6 = \text{Hz}$, $J_{1,3} = 17,2 \text{ Hz}$, $J_{1,5} = 29,2 \text{ Hz}$, 1- $\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 5,00 (d, 1H, $J_{1,2} = \text{Hz}$, H-1), 4,41-3,86 (m, 8H, H-2, 3, 4, 5, 6a, 6b, 1- $\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$) ppm.

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ = 137,04-126,22 (12C, $\text{C}_{\text{arom.}}$), 133,42 (1- $\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 118,04 (1- $\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 102,20 (C-1), 97,66 (PhCH), 79,39 (C-5), 72,58 (C-3), 68,75 (C-2), 68,49 (C-4), 67,44 (1- $\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 63,47 (C-6) ppm. **ESI-MS**: m/z calculé pour $[\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{O}_5\text{F}+\text{H}]^+$: 415,1557; trouvé: 415,2.

2-Désoxy-2-fluoro- α -D-mannopyrannoside d'allyle (**52**)



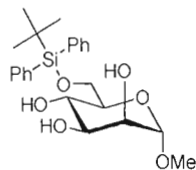
Une quantité de 3-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidène-2-désoxy-2-fluoro- α -D-mannopyrannoside d'allyle **51** (22 mg, 0,05 mmol) est dissoute dans un mélange acide acétique-eau 4:1 (0,5 mL) puis chauffé à 80°C . La réaction est suivie par CCM ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 1:9) jusqu'à disparition complète du produit de départ (2h). Le mélange réactionnel est concentré, dissous dans un mélange MeOH/MeONa (pH=10) puis laissé agiter à t.p. pendant 1h. Le produit brut résultant est neutralisé à la résine Amberlite IR-120 (H^+), filtré, évaporé puis purifié sur colonne de silice ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 1:9) pour donner une huile incolore de 2-désoxy-2-fluoro- α -D-mannopyrannoside d'allyle **52** (11 mg, 95% rend.); Rf =0,45 ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 1:9). ^1H NMR (300 MHz, D_2O , 25°C): δ = 5,88 (m, 1H, 1- $\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 5,31 (ddd, 2H, J_{1-2} 0,6 = Hz, J_{1-3} = 17,1 Hz, J_{1-4} = 31,6 Hz, 1- $\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 4,87 (s, 1H, H-1), 4,18-3,46 (m, 8H, H-2, 3, 4, 5, 6a, 6b, 1- $\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, D_2O + acétone, 25°C): δ = 134,12 (1- $\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 117,60 (1- $\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 108,83 (C-1), 93,05 (C-2), 81,29 (C-5), 71,04 (C-3), 70,87 (C-4), 69,93 (1- $\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 62,62 (C-6) ppm. **ESI-MS**: m/z calculé pour $[\text{C}_9\text{H}_{15}\text{O}_5\text{F}+\text{H}]^+$: 223,0982; trouvé: 223,1.

6-*O*-*tert*-Butyldiphénylsilyl- α -D-mannopyrannoside de méthyle (**59**)^{138,139,140}

¹³⁸ Chervenak, M. C., and Toone, E. J., *Bioorg. Med. Chem.*, **1996**, 4, 1963-1977

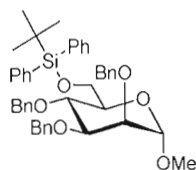
¹³⁹ Hu, G., and Vasella, A., *Helv. Chim. Acta*, **2002**, 86, 4369-4391

¹⁴⁰ Davis B. G., Nash, R. J., Watson, A. A., Smith, C., and Fleet, G. W. J., *Tetrahedron*, **1999**, 55, 4501-4520



Une quantité d' α -D-mannopyrannoside de méthyle **58** (1,18 g, 6,05 mmol) est dissoute dans un volume de pyridine (60 mL). La solution est ensuite refroidie à 0°C dans un bain de glace, puis un volume de TBDPSCl (1,8 mL, 6,9 mmol, 1,1 équiv.) est ajouté. La réaction est ensuite laissée revenir à température pièce et suivie par CCM (AcOEt/Hex 9:1) jusqu'à disparition complète du produit de départ (16h). Le produit brut résultant est extrait à l'acétate d'éthyle, lavé au KHSO₄ saturé, lavé au NaHCO₃ saturé, lavé au NaCl saturé, séché au Na₂SO₄, concentré puis purifié sur colonne de silice (AcOEt/Hex 9:1) pour donner une huile incolore de 6-*O*-*tert*-butyldiphénylsilyl- α -D-mannopyrannoside de méthyle **59** (2,30 g, 88% rend.); R_f=0,42 (AcOEt/Hex 9:1). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 7,76-7,35 (m, 10H, H_{arom.}), 4,67 (s, 1H, H-1), 3,99-3,61 (m, 6H, H-2, 3, 4, 5, 6a, 6b), 3,30 (s, 3H 1-OCH₃), 1,09 (s, 9H, SiC(CH₃)₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 155,67-134,74 (12C, C_{arom.}), 100,50 (C-1), 71,51 (C-5), 70,84 (C-2), 71,16 (C-3), 65,09 (C-4), 60,39 (C-6), 54,66 (1-OCH₃), 26,71 (SiC(CH₃)₃), 26,49 (3C, SiC(CH₃)₃) ppm. ESI-MS: m/z calculé pour [C₂₃H₃₂O₆Si+Na]⁺: 455,1866; trouvé: 455,2.

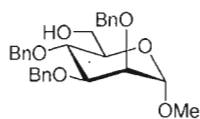
2,3,4-Tri-*O*-Benzyl-6-*O*-*tert*-butyldiphénylsilyl- α -D-mannopyrannoside de méthyle (60**)**^{138,141}



¹⁴¹ Mikkelsen, L. M., Krintel, S. L., Jiménez-Barbero, J., and Skrydstrup, T., *JOC*, **2002**, 67, 6297-6308

Une quantité de 6-*O-tert*-butyldiphénylsilyl- α -D-mannopyrannoside de méthyle **59** (2,24 g, 7,27 mmol) est dissoute dans un volume de DMF (36 mL). Une quantité catalytique de TBAI est ajoutée (268 mg, 0,72 mmol, 0,1 équiv.) puis le mélange réactionnel est refroidi à 0°C sur bain de glace. Une quantité de NaH 60% (1,05 g, 25,3 mmol, 3,5 équiv.) lavé à l'hexane en solution dans le DMF (36 mL) est ajoutée. Après la fin du dégagement gazeux (1h), le bain de glace est enlevé puis une quantité de BnBr (3,0 mL, 25,2 mmol, 3,5 équiv.) est ajoutée. La réaction est suivie par CCM (AcOEt/Hex 1:4) jusqu'à disparition complète du produit de départ (16h). Le produit brut résultant est concentré puis purifié sur colonne de silice (AcOEt/Hex 1:4) pour donner une huile incolore 2,3,4-tri-*O*-benzyl-6-*O-tert*-butyldiphénylsilyl- α -D-mannopyrannoside de méthyle **60** (2,84 g, 78% rend.); Rf=0,32 (AcOEt/Hex 1:4); $[\alpha]_D^{23} = +29$ (c= 1,0, CHCl₃). **¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25°C):** δ = 7,78-7,25 (m, 25H, H_{arom.}), 4,66 (s, 1H, H-1), 4,07-3,65 (m, 12H, H-2, 3, 4, 5, 6a, 6b, 1-OCH₂Ph, 2-OCH₂Ph, 3-OCH₂Ph), 3,32 (s, 3H, 1-OCH₃), 1,08 (s, 9H, SiC(CH₃)₃) ppm. **¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25°C):** δ = 155,63-134,40 (25C, C_{arom.}), 100,16 (C-1), 71,96 (C-5), 70,95 (C-2), 71,62 (C-3), 65,70 (C-4), 60,31 (C-6), 54,83 (1-OCH₃), 26,88 (SiC(CH₃)₃), 26,73 (3C, SiC(CH₃)₃) ppm. **ESI-MS:** m/z calculé pour [C₄₄H₅₀O₆Si+Na]⁺: 725,3274; trouvé: 725,3.

2,3,4-Tri-*O*-benzyl- α -D-mannopyrannoside de méthyle (**61**)^{138,142,143}



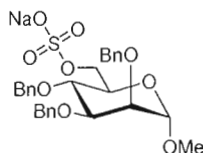
Une quantité de 2,3,4-tri-*O*-benzyl-6-*O-tert*-butyldiphénylsilyl- α -D-mannopyrannoside de méthyle **60** (1,64 g, 2,34 mmol) est dissoute dans un volume de THF (36 mL). Une quantité catalytique d'AcOH est ajoutée (13 mL, 0,23 mmol, 0,1 équiv.) puis un volume de TBAF en solution dans le THF est ajoutée (3,5 mL, 3,5 mmol, 1,5 équiv.). La

¹⁴² Borén, H. B., Eklind, K., Garegg, P. J., Lindberg, B., and Pilotti, A., *Acta Chem. Scand.*, **1972**, 26, 4143-4146

¹⁴³ Takahashi, H., Fukuda, T., Mitsuzuka, H., Namme, R., Miyamoto, H., Ohkura, Y., and Ikegami, S., *Angew. Chem.*, **2003**, 42, 5069-5070

réaction est suivie par CCM (AcOEt/Hex 4,5:5,5) jusqu'à disparition complète du produit de départ (16h). Le produit brut résultant est concentré puis purifié sur colonne de silice (AcOEt/Hex 4,5:5,5) pour donner une huile incolore de 2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -D-mannopyrannoside de méthyle **61** (0,99 g, 91% rend.); Rf=0,41 (AcOEt/Hex 4,5:5,5); $[\alpha]_D^{23} = +30$ (c= 1.0, CHCl₃). **¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25°C):** δ = 7,38-7,20 (m, 15H, H_{arom.}), 5,00-4,60 (m, 7H, H-1, 1-OCH₂Ph, 2-OCH₂Ph, 3-OCH₂Ph), 4,03-3,60 (m, 6H, H-2, 3, 4, 5, 6a, 6b), 3,38 (s, 3H, 1-OCH₃) ppm. **¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25°C):** δ = 155,51-134,46 (18C, C_{arom.}), 101,57 (C-1), 79,86 (C-5), 79,25 (C-2), 77,17 (C-3), 73,26 (C-4), 73,01 (3C, 2-OCH₂Ph, 3-OCH₂Ph, 4-OCH₂Ph), 62,15 (C-6), 54,24 (1-OCH₃) ppm. **ESI-MS:** m/z calculé pour [C₂₈H₃₂O₆+H]⁺: 487,2097; trouvé: 487,2.

6-*O*-Sulfonato-2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -D-mannopyrannoside de méthyle (**62**)¹⁴⁴

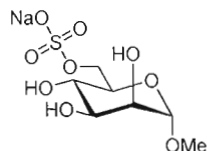


Une quantité de 6-*O*-sulfonato-2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -D-mannopyrannoside de méthyle **61** (104 mg, 0,22 mmol) est dissoute dans un volume de THF (2 mL). Une quantité de SO₃•Et₃N (104 mg, 0,57 mmol, 2,5 équiv.) est ajoutée. La réaction est suivie par CCM (MeOH/AcOEt 1:9) jusqu'à disparition complète du produit de départ (4h). Le produit brut résultant est concentré puis purifié sur colonne de silice (MeOH/AcOEt 1:9) pour donner un solide blanc de 6-*O*-sulfonato-2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -D-mannopyrannoside de méthyle **62** (69 mg, 57% rend.); Rf=0,35 (MeOH/AcOEt 1:9); $[\alpha]_D^{23} = +58$ (c= 1.0, MeOH). **¹H NMR (300 MHz, D₂O, 25°C):** δ = 7,36-7,26 (m, 15H, H_{arom.}), 5,57 (s, 1H, H-1), 4,71-4,67 (m, 7H, H-1, 1-OCH₂Ph, 2-OCH₂Ph, 3-OCH₂Ph), 3,87-3,62 (m, 6H, H-2, 3, 4, 5, 6a, 6b), 3,30 (s, 3H, 1-OCH₃) ppm. **¹³C NMR (75 MHz, D₂O + acétone, 25°C):** δ = 157,93-128,18 (18C, C_{arom.}), 101,39 (C-1), 79,90 (C-5), 79,28 (C-2), 77,20 (C-3), 73,28 (C-4), 73,01 (3C, 2-OCH₂Ph, 3-

¹⁴⁴ Vidal, S., Garcia, M., Montero, J.-L., and Morère, A., *Bioorg. Med. Chem.*, **2002**, 10, 4051-4056

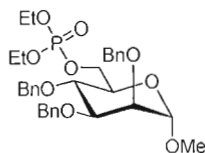
OCH₂Ph, 4-OCH₂Ph), 72,40 (C-6), 67,94 (1-OCH₃) ppm. **ESI-MS**: m/z calculé pour [C₂₈H₃₂O₉S+H]⁺: 567,1665; trouvé: 567,1.

6-O-Sulfonato- α -D-mannopyrannoside de méthyle (63)¹⁴⁴



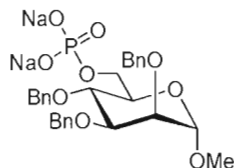
Des quantités de 6-O-sulfonato-2,3,4-tri-O-benzyl- α -D-mannopyrannoside de méthyle **62** (69 mg, 0,13 mmol) et de Pd(OH)₂/C 20% m/m (7 mg) sont dissoutes dans un mélange EtOH/H₂O 1:1 (4 mL). Une quantité catalytique de HCl sec préalablement formé *in situ* (AcCl/MeOH 1:24) est ajouté au mélange (0,5 mL, 0,01 mmol, 0,1 équiv.). Le mélange réactionnel est d'abord purgé en faisant barboter de l'azote puis une pression d'hydrogène est exercée au-dessus du liquide. La réaction est suivie par CCM (MeOH/DCM 3:7) jusqu'à disparition complète du produit de départ (16h). Le produit brut résultant est filtré sur terre de diatomée, concentré puis purifié sur colonne de silice (MeOH/DCM 3:7) pour donner un solide blanc de 6-O-sulfonato- α -D-mannopyrannoside de méthyle **63** (25 mg, 82% rend.); T_{fus}: 156-159°C; R_f=0,19 (MeOH/DCM 3:7). **¹H NMR (300 MHz, D₂O, 25°C)**: δ = 5,40 (s, 1H, H-1), 3,85-3,32 (m, 6H, H-2, 3, 4, 5, 6a, 6b), 3,32 (s, 3H, 1-OCH₃) ppm. **¹³C NMR (75 MHz, D₂O + acétone, 25°C)**: δ = 102,18 (C-1), 75,06 (C-5), 74,83 (C-2), 72,84 (C-3), 71,22 (3C, 2-OCH₂Ph, 3-OCH₂Ph, 4-OCH₂Ph), 70,08 (C-4), 69,45 (C-6), 55,81 (1-OCH₃) ppm. **ESI-MS**: m/z calculé pour [C₇H₁₄O₉S+H]⁺: 276,0515; trouvé: 276,0.

6-O-diéthylphospho-2,3,4-tri-O-benzyl- α -D-mannopyrannoside de méthyle (64)



Une quantité de 6-*O*-diéthylphospho-2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -D-mannopyrannoside de méthyle **64** (97 mg, 0,21 mmol) est dissoute dans un volume de DCM (2 mL). Des quantités d'Et₃N (0,1 mL, 0,23 mmol, 1,1 équiv.) et de POCl(OEt)₂ (0,1 mL, 0,23 mmol, 1,1 équiv.) sont ajoutées au mélange réactionnel. La réaction est suivie par CCM (AcOEt/Hex 3:2) jusqu'à disparition complète du produit de départ (2h). Le produit brut résultant est concentré puis purifié sur colonne de silice (AcOEt/Hex 3:2) pour donner une huile incolore de 6-*O*-diéthylphosphonato-2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -D-mannopyrannoside de méthyle **65** (66 mg, 56% rend.); R_f=0,30 (AcOEt/Hex 3:2). **¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25°C):** δ = 7,29-7,22 (m, 15H, H_{arom}), 5,58 (s, 1H, H-1), 4,68-3,72 (m, 10H, H-2, 3, 4, 5, 6a, 6b, P(OCH₂CH₃)₂, 2-OCH₂Ph, 3-OCH₂Ph, 4-OCH₂Ph), 3,36 (s, 3H, 1-OCH₃), 1,21 (m, 6H, P(OCH₂CH₃)₂) ppm. **¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25°C):** δ = 157,27-129,32 (18C, C_{arom}), 101,12 (C-1), 80,02 (C-5), 79,35 (C-2), 77,14 (C-3), 73,09 (C-4), 72,96 (3C, 2-OCH₂Ph, 3-OCH₂Ph, 4-OCH₂Ph), 72,17 (C-6), 67,82 (1-OCH₃), 64,17 (PO(CH₂CH₃)₂), 16,43 (PO(CH₂CH₃)₂) ppm. **ESI-MS:** m/z calculé pour [C₃₂H₄₁O₉P+H]⁺: 601,2566; trouvé: 601,3.

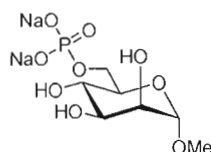
6-*O*-Diéthylphosphonato-2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -D-mannopyrannoside de méthyle (**65**)



Une quantité de 6-*O*-diéthylphospho-2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -D-mannopyrannoside de méthyle **64** (65 mg, 0,11 mmol) est dissoute dans un volume de DCM (1 mL). Des quantités de NaI (35 mg, 0,23 mmol, 2,2 équiv.) et de TMSCl (0,03 mL, 0,28 mmol, 2,2 équiv.) sont ajoutées au mélange réactionnel. La réaction est suivie par CCM (MeOH/DCM 1:9) jusqu'à disparition complète du produit de départ (16h). Le produit brut résultant est concentré puis purifié sur colonne de silice (MeOH/DCM 1:9) pour donner un solide jaune de 6-*O*-diéthylphosphonato-2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -D-mannopyrannoside de méthyle **65** (57 mg, 97% rend.); R_f=0,10 (MeOH/DCM 1:9). **¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25°C):** δ = 7,26-7,21 (m, 15H, H_{arom}), 5,56 (s, 1H, H-1), 4,72-3,68 (m, 10H, H-2, 3, 4, 5, 6a, 6b, P(OCH₂CH₃)₂, 2-

OCH₂Ph, 3-OCH₂Ph, 4-OCH₂Ph), 3,31 (s, 3H, 1-OCH₃), 1,22 (m, 6H, P(OCH₂CH₃)₂) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 157,56-128,66 (12C, C_{arom}), 101,42 (C-1), 80,14 (C-5), 79,42 (C-2), 77,25 (C-3), 73,13 (C-4), 73,05 (3C, 2-OCH₂Ph, 3-OCH₂Ph, 4-OCH₂Ph), 72,09 (C-6), 67,69 (1-OCH₃) ppm. **ESI-MS**: m/z calculé pour [C₂₈H₃₃O₉P+H]⁺: 545,1940; trouvé: 545,2.

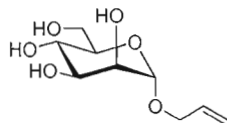
6-*O*-Diéthylphosphonato-α-D-mannopyrannoside de méthyle (66)¹⁴⁵



Des quantités de 6-*O*-diéthylphosphonato-2,3,4-tri-*O*-benzyl-α-D-mannopyrannoside de méthyle **65** (59 mg, 0,11 mmol) et de Pd(OH)₂/C 20% m/m (6 mg) sont dissoutes dans un mélange EtOH/H₂O 1:1 (4 mL). Une quantité catalytique de HCl sec préalablement formé *in situ* (AcCl/MeOH 1:24) est ajouté au mélange (0,5 mL, 0,01 mmol, 0,1 équiv.). Le mélange réactionnel est d'abord purgé en faisant barboter de l'azote puis une pression d'hydrogène est exercée au-dessus du liquide. La réaction est suivie par CCM (MeOH/DCM 3:7) jusqu'à disparition complète du produit de départ (16h). Le produit brut résultant est filtré sur terre de diatomée, concentré puis purifié sur colonne de silice (MeOH/DCM 3:7) pour donner un solide blanc de 6-*O*-diéthylphosphonato-α-D-mannopyrannoside de méthyle **66** (25 mg, 82% rend.); R_f=0,19 (MeOH/DCM 3:7). ¹H NMR (300 MHz, D₂O, 25°C): δ = 5,45 (s, 1H, H-1), 3,92-3,28 (m, 6H, H-2, 3, 4, 5, 6a, 6b), 3,30 (s, 3H, 1-OCH₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, D₂O + acétone, 25°C): δ = 101,17 (C-1), 74,97 (C-5), 74,85 (C-2), 72,77 (C-3), 71,14 (3C, 2-OCH₂Ph, 3-OCH₂Ph, 4-OCH₂Ph), 69,71 (C-4), 69,34 (C-6), 55,72 (1-OCH₃) ppm. **ESI-MS**: m/z calculé pour [C₇H₁₅O₉P+H]⁺: 275,0532; trouvé: 275,1.

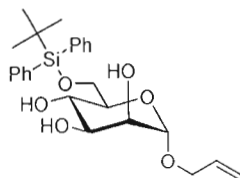
α-D-Mannopyrannoside d'allyle (7)

¹⁴⁵ Chenault, H. K., Mandes, R. F., and Hornberger, K. R., *JOC*, **1997**, 62, 331-336



Une quantité de α -D-mannopyranoside **68** (1,03 g, 5,73mmol) est dissoute dans un volume d'alcool allylique (57 mL). Une quantité catalytique de TFA (0,56 mL, 0,48 mmol, 0,1 équiv.) est ajoutée au mélange réactionnel et le tout est chauffé à reflux (98°C). La réaction est suivie par CCM (AcOEt/Hex 1:1) jusqu'à disparition complète du produit de départ (3h). Le produit brut résultant est concentré (co-évaporation de l'alcool allylique avec de l'acétone) puis purifié sur colonne de silice (AcOEt/Hex 1:1) pour donner une huile incolore. Le produit brut purifié est dissous dans un mélange MeOH/MeONa (pH=10) puis laissé agiter à t.p. pendant 1h. Le produit brut résultant est neutralisé à la résine Amberlite IR-120 (H^+), filtré, évaporé puis lyophilisé pour donner un solide blanc d' α -D-mannopyranoside d'allyle **7** (1,26 g, 75% rend. sur deux étapes) $T_{fus.}$: 98-99°C¹⁴⁶ ; $R_f=0,51$, (H_2O/ACN 1:9) ; $[\alpha]_D^{25} = +116$ ($c=1.0$, MeOH); 1H RMN (300 MHz, D_2O , 25°C): $\delta = 6,13-5,84$ (m, 1H, 1-OCH₂CH=CH₂), 5,10-5,27 (m, 2H, 1-OCH₂CH=CH₂), 4,92 (s, 1H, H-1), 4,28-4,05 (m, 2H, 1-OCH₂CH=CH₂), 3,95-3,66 (m, 6H, H-2, 3, 4, 5, 6a, 6b) ppm. ^{13}C RMN (75 MHz, D_2O + acétone): $\delta = 133,93$ (1-OCH₂CH=CH₂), 119,15 (1-OCH₂CH=CH₂), 99,62 (C-1), 73,46 (C-5), 71,21 (C-2), 70,72 (C-3), 68,75 (1-OCH₂CH=CH₂), 67,42 (C-4), 61,54 (C-6) ppm. **ESI-MS**: m/z calculé pour $[C_9H_{16}O_6+Na]^+$: 243,0845; trouvé: 243,1.

6-O-tert-Butyldiphénylsilyl- α -D-mannopyranoside d'allyle (69**)**^{147,148}



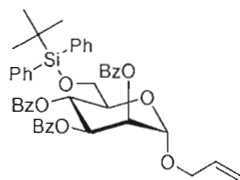
¹⁴⁶ Boss, R. and Scheffold, R., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1976**, 88, 578-579

¹⁴⁷ Cmoch, P., and Pakulski, Z., *Tetrahedron Asym.*, **2008**, 19, 1494-1503

¹⁴⁸ Heng, L., Ning, J., and Kong, F., *J. Carb. Chem.*, **2001**, 20, 285-296

Une quantité de α -D-mannopyrannoside d'allyle **7** (1,20 g, 5,4 mmol) est dissoute dans un volume de pyridine (54 mL). La solution est ensuite refroidie à 0°C dans un bain de glace, puis un volume de TBDPSCl (1,6 mL, 5,9 mmol, 1,1 équiv.) est ajouté. La réaction est ensuite laissée revenir à température pièce et suivie par CCM (AcOEt/Hex 9:1) jusqu'à disparition complète du produit de départ (16h). Le produit brut résultant est extrait à l'acétate d'éthyle, lavé au KHSO₄ saturé, lavé au NaHCO₃ saturé, lavé au NaCl saturé, séché au Na₂SO₄, concentré puis purifié sur colonne de silice (AcOEt/Hex 9:1) pour donner une huile incolore de 6-*O*-*tert*-butyldiphénylsilyl-2,3,4-tri-*O*-benzoyl- α -D-mannopyrannoside d'allyle **69** (2,33 g, 93% rend.); R_f=0,56 (AcOEt/Hex 9:1). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 7,71-7,35 (m, 10H, H_{arom}), 5,92-5,79 (m, 1H, J_{1,2} = 5,9 Hz, 1-OCH₂CH=CH₂), 5,27-5,15 (dd, 2H, J_{1,2}=5,2 Hz, 1-OCH₂CH=CH₂), 4,82 (s, 1H, H-1), 4,16-3,61 (m, 8H, H-2, 3, 4, 5, 6a, 6b, 1-OCH₂CHCH₂), 1,06 (s, 9H, SiC(CH₃)₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 135,57-127,74 (13C, C_{arom}, 1-OCH₂CH=CH₂), 117,57 (1-OCH₂CH=CH₂), 98,59 (C-1), 71,69 (C-5), 71,40 (C-2), 70,42 (C-3), 69,69 (C-4), 67,80 (1-OCH₂CH=CH₂), 64,91 (C-6), 26,74 (3C, SiC(CH₃)₃), 19,14 (1C, SiC(CH₃)₃) ppm. ESI-MS: m/z calculé pour [C₂₅H₃₄O₆Si+Na]⁺:481,2022 ; trouvé: 481,2.

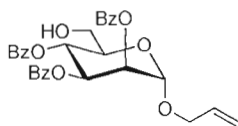
2,3,4-Tri-*O*-benzoyl-6-*tert*-butyldiphénylsilyl- α -D-mannopyrannoside d'allyle (**71**)



Une quantité de 6-*O*-*tert*-butyldiphénylsilyl- α -D-mannopyrannoside d'allyle **60** (2,37 g, 5,17 mmol) est dissoute dans un volume de pyridine (52 mL). La solution est ensuite refroidie à 0°C dans un bain de glace, puis un volume de chlorure de benzoyle (2,2 mL, 19,0 mmol, 3,6 équiv.) est ajouté. La réaction est ensuite laissée revenir à température pièce et suivie par CCM (AcOEt/Hex 1:9) jusqu'à disparition complète du produit de départ (16h). Le produit brut résultant est extrait à l'acétate d'éthyle, lavé au KHSO₄ saturé, lavé au NaHCO₃ saturé, lavé au NaCl saturé, séché au Na₂SO₄, concentré puis purifié sur colonne de silice

(AcOEt/Hex 1:9) pour donner une huile incolore de 6-*O*-*tert*-butyldiphénylsilyl-2,3,4-tri-*O*-benzoyl- α -D-mannopyrannoside d'allyle **71** (3,60 g, 91% rend.); Rf=0,24 (AcOEt/Hex 1:9). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ = 8,22-7,19 (m, 25H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6,23 (t, 1H, J_{1-2} = 10,1 Hz, H-4), 6,03 (m, 1H, H-3), 5,97 (m, 1H, 1-OCH₂CH=CH₂), 5,81 (dd, 1H, J_{1-2} = 1,6 Hz, J_{1-3} = 3,2, H-2), 5,39 (m, 2H, 1-OCH₂CH=CH₂), 5,24 (d, 1H, J_{1-2} = 1,5 Hz, H-1), 4,41-3,901 (m, 5H, H-5, 6a, 6b, 1-OCH₂CH=CH₂), 1,14 (s, 9H, SiC(CH₃)₃) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ = 135,59-127,50 (30C, $\text{C}_{\text{arom.}}$, 1-OCH₂CH=CH₂), 118,03 (1-OCH₂CH=CH₂), 96,49 (C-1), 71,45 (C-5), 70,68 (C-2), 70,58 (C-3), 68,35 (C-4), 66,55 (1-OCH₂CH=CH₂), 62,48 (C-6), 26,54 (3C, SiC(CH₃)₃), 19,11 (1C, SiC(CH₃)₃) ppm. ESI-MS: m/z calculé pour $[\text{C}_{46}\text{H}_{46}\text{O}_9\text{Si}+\text{H}]^+$: 771,2989; trouvé: 771,3.

2,3,4-Tri-*O*-benzoyl- α -D-mannopyrannoside d'allyle (**72**)¹⁴⁹

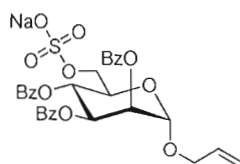


Une quantité de 6-*O*-*tert*-butyldiphénylsilyl-2,3,4-tri-*O*-benzoyl- α -D-mannopyrannoside d'allyle **71** (63 mg, 0,082 mmol) est dissoute dans un volume de THF (0,8 mL). Une quantité catalytique d'AcOH est ajoutée (0,06 mL, 0,001 mmol, 0,1 équiv.) puis un volume de TBAF en solution dans le THF est ajoutée (0,8 mL, 1,5 équiv.). La réaction est suivie par CCM (AcOEt/Hex 3:7) jusqu'à disparition complète du produit de départ (16h). Le produit brut résultant est concentré puis purifié sur colonne de silice (AcOEt/Hex 3:7) pour donner une huile incolore de 2,3,4-tri-*O*-benzoyl- α -D-mannopyrannoside d'allyle **72** (29 mg, 67% rend.); Rf=0,22 (AcOEt/Hex 3:7). $[\alpha]_{\text{D}}^{23}$ = -108 (c= 1,0, CHCl_3). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ = 8,13-7,22 (m, 15H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6,02 (dd, 1H, J_{1-2} = 10,1 Hz, J_{1-3} = 3,4 Hz, H-3), 5,99-5,93 (m, 1H, 1-OCH₂CH=CH₂), 5,87 (t, 1H, J_{1-2} = J_{1-3} = 10,1 Hz, H-4), 5,71 (dd, 1H, J_{1-2} = 3,4 Hz, J_{1-3} = 1,8 Hz, H-2), 5,43-5,26 (m, 2H, 1-OCH₂CH=CH₂), 5,17 (d, 1H, J_{1-2} = 1,7 Hz, H-1), 4,35-4,28 (m, 1H, 1-OCH₂CH=CH₂), 4,17-4,01 (m, 2H, H-5 et 1-OCH₂CH=CH₂),

¹⁴⁹ Auzanneau, F.-I., Christensen, M.K., Harris, S. L., Medal, M., and Pinto, M., *Can. J. Chem.*, **1998**, 76, 1109-1118

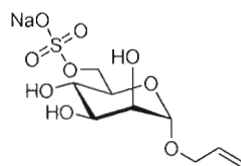
3,88-3,76 (m, 2H, H-6a, 6b), 2,76 ppm. ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ = 166,41-128,28 (21C, $\text{C}_{\text{arom.}}$, 2- $\text{OC}=\text{OPh}$, 3- $\text{OC}=\text{OPh}$, 4- $\text{OC}=\text{OPh}$), 133,40, (1- $\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 118,32 (1- $\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 96,70 (C-1), 71,06 (C-5), 70,64 (C-2), 69,65 (C-4), 68,74 (1- $\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 67,21 (C-4), 61,28 (C-6) ppm. ESI-MS: m/z calculé pour $[\text{C}_{30}\text{H}_{28}\text{O}_9+\text{Na}]^+$: 555,1631; trouvé: 555,2.

6-*O*-Sulfonato-2,3,4-tri-*O*-benzoyl- α -D-mannopyrannoside d'allyle (73)



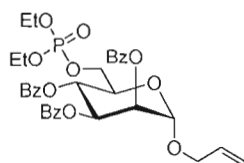
Une quantité de 2,3,4-tri-*O*-benzoyl- α -D-mannopyrannoside d'allyle **72** (203 mg, 0,38 mmol) est dissoute dans un volume de THF (3,8 mL). Une quantité de $\text{SO}_3\cdot\text{Et}_3\text{N}$ (175 mg, 0,96 mmol, 2,5 équiv.) est ajoutée. La réaction est suivie par CCM (MeOH/AcOEt 1:9) jusqu'à disparition complète du produit de départ (4h). Le produit brut résultant est concentré puis purifié sur colonne de silice (MeOH/AcOEt 1:9) pour donner un solide blanc de 6-*O*-sulfonato-2,3,4-tri-*O*-benzoyl- α -D-mannopyrannoside d'allyle **73** (161 mg, 69% rend.); R_f =0,24 (MeOH/AcOEt 1:9). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ = 8,08-7,19 (m, 15H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 5,98 (dd, 1H, $J_{1,2}$ = 10,2 Hz, $J_{1,3}$ = 3,5 Hz, H-3), 5,97-5,91 (m, 1H, 1- $\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 5,85 (t, 1H, $J_{1,2}$ = $J_{1,3}$ = 10,2 Hz, H-4), 5,69 (dd, 1H, $J_{1,2}$ = 3,5 Hz, $J_{1,3}$ = 1,8 Hz, H-2), 5,44-5,26 (m, 2H, 1- $\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 5,22 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 1,7 Hz, H-1), 4,42-4,27 (m, 1H, 1- $\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 4,21-3,99 (m, 2H, H-5 et 1- $\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 3,92-3,74 (m, 2H, H-6a, 6b), 2,76 ppm. ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ = 165,63-129,91 (21C, $\text{C}_{\text{arom.}}$, 2- $\text{OC}=\text{OPh}$, 3- $\text{OC}=\text{OPh}$, 4- $\text{OC}=\text{OPh}$), 133,41, (1- $\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 117,81 (1- $\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 93,62 (C-1), 73,38 (C-5), 72,10 (C-2), 71,43 (C-4), 71,07 (1- $\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 69,27 (C-4), 61,52 (C-6) ppm. ESI-MS: m/z calculé pour $[\text{C}_{30}\text{H}_{28}\text{O}_{12}\text{S}+\text{H}]^+$: 613,1380; trouvé: 613,1.

6-*O*-Sulfonato- α -D-mannopyrannoside d'allyle (74)



Une quantité de 6-*O*-sulfonato-2,3,4-tri-*O*-benzoyl- α -D-mannopyrannoside d'allyle **73** (97 mg, 0,16 mmol) est dissoute dans un mélange MeOH/MeONa (pH=10) puis laissé agiter à t.p. pendant 1h. Le produit brut résultant est neutralisé à la résine Amberlite IR-120 (H^+), filtré, évaporé puis purifié sur colonne de silice (H_2O/ACN 1:9) pour donner un solide blanc de 6-*O*-sulfonato- α -D-mannopyrannoside d'allyle **74** (47 mg, 99% rend.); $R_f=0,10$ (H_2O/ACN 1:9). 1H RMN (300 MHz, D_2O , 25°C): δ = 6,23-5,78 (m, 1H, 1- $OCH_2CH=CH_2$), 5,08-5,32 (m, 2H, 1- $OCH_2CH=CH_2$), 4,95 (s, 1H, H-1), 4,29-3,97 (m, 2H, 1- $OCH_2CH=CH_2$), 3,92-3,64 (m, 6H, H-2, 3, 4, 5, 6a, 6b) ppm. ^{13}C RMN (75 MHz, D_2O + acétone): δ = 133,66 (1- $OCH_2CH=CH_2$), 118,54 (1- $OCH_2CH=CH_2$), 98,23 (C-1), 75,05 (C-5), 74,53 (C-2), 73,93 (C-3), 70,48 (1- $OCH_2CH=CH_2$), 69,45 (C-4), 69,62 (C-6) ppm. ESI-MS: m/z calculé pour $[C_9H_{16}O_9S+H]^+$: 301,0593; trouvé: 301,1.

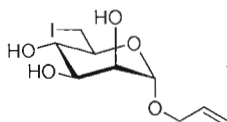
6-*O*-Diéthylphospho-2,3,4-tri-*O*-benzoyl- α -D-mannopyrannoside d'allyle (**75**)



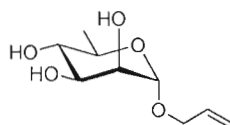
Une quantité de 2,3,4-tri-*O*-benzoyl- α -D-mannopyrannoside d'allyle **72** (226 mg, 0,42 mmol) est dissoute dans un volume de DCM (4 mL). Des quantités d' Et_3N (0,07 mL, 0,50 mmol, 1,1 équiv.) et de $POCl(OEt)_2$ (0,07 mL, 0,48 mmol, 1,1 équiv.) sont ajoutées au mélange réactionnel. La réaction est suivie par CCM ($AcOEt/Hex$ 3:2) jusqu'à disparition complète du produit de départ (2h). Le produit brut résultant est concentré puis purifié sur colonne de silice ($AcOEt/Hex$ 3:2) pour donner une huile incolore de 6-*O*-diéthylphospho-2,3,4-tri-*O*-benzoyl- α -D-mannopyrannoside d'allyle **75** (182 mg, 64% rend.); $R_f=0,33$ ($AcOEt/Hex$ 3:2). 1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$, 25°C): δ = 7,31-7,23 (m, 15H, H_{arom}), 6,01-

5,94 (m, 1H, 1-OCH₂CH=CH₂), 5,61 (s, 1H, H-1), 5,45-5,24 (m, 2H, 1-OCH₂CH=CH₂), 4,73-3,69 (m, 12H, H-2, 3, 4, 5, 6a, 6b, 1-OCH₂CH=CH₂, P(OCH₂CH₃)₂), 1,23 (m, 6H, P(OCH₂CH₃)₂) ppm. ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 166,84-128,58 (21C, C_{arom.}, 2-OC=OPh, 3-OC=OPh, 4-OC=OPh), 133,64, (1-OCH₂CH=CH₂), 118,35 (1-OCH₂CH=CH₂), 99,24 (C-1), 73,41 (C-5), 71,03 (C-2), 69,04 (C-4), 66,87 (1-OCH₂CH=CH₂), 64,79 (C-4), 64,05 (C-6), (PO(CH₂CH₃)₂), (PO(CH₂CH₃)₂) ppm. ESI-MS: m/z calculé pour [C₃₄H₃₇O₁₂P+Na]⁺: 691,1920; trouvé: 691,2.

6-Iodo-α-D-rhamnopyrannoside d'allyle (80)



Une quantité de 6-iodo-α-D-rhamnopyrannoside d'allyle 7 (2,47 g, 11,2 mmol) est dissoute dans un volume de THF (90 mL) puis chauffé à reflux (65°C). Des quantités de PPh₃ (5,94 g, 22,7 mmol, 2,0 équiv.) et d'imidazole (1,93 g, 28,3 mmol, 2,5 équiv.) sont rajoutées au mélange réactionnel. Ensuite, une quantité d'iode (5,60 g, 22,1 mmol, 2,0 équiv.) en solution dans le THF est ajoutée goutte à goutte dans le ballon et laissée agiter toujours à température de reflux (65°C). La réaction est suivie par CCM (MeOH/CHCl₃ 1:9) jusqu'à disparition complète du produit de départ (1h). Le produit brut résultant est concentré puis purifié sur colonne de silice (MeOH/CHCl₃ 0,5:9,5) pour donner une huile jaune 6-iodo-α-D-rhamnopyrannoside d'allyle **80** (3,52 g, 99% rend.); R_f=0,29 (MeOH/CHCl₃ 1:9); [α]_D²³ = +58 (c = 1,0, MeOH). ¹H RMN (300 MHz, D₂O, 25°C): δ = 5,92-5,79 (m, 1H, 1-OCH₂CH=CH₂), 5,26-5,09 (m, 2H, 1-OCH₂CH=CH₂), 4,69 (d, 1H, J_{1,2} = 1,8 Hz, H-1), 4,25-3,91 (m, 2H, 1-OCH₂CH=CH₂), 3,71 (dd, 1H, J_{1,2} = 1,8 Hz, J_{2,3} = 3,6 Hz, H-2), 3,60-3,43 (m, 2H, H-3, H-4), 3,43-3,11 (m, 3H, H-5, 6a, 6b) ppm. ¹³C RMN (75 MHz, D₂O + acétone): δ = 125,71 (1-OCH₂CH=CH₂), 108,10 (1-OCH₂CH=CH₂), 91,14 (C-1), 64,96 (C-5), 63,02 (C-2), 62,83 (C-3), 62,61 (1-OCH₂CH=CH₂), 59,37 (C-4), 3,09 (C-6) ppm. ESI-MS: m/z calculé pour [C₉H₁₅O₅I+Na]⁺: 352,9862; trouvé: 353,0.

α -D-Rhamnopyrannoside d'allyle (81**)****Méthode 1: Reflux classique au toluène**

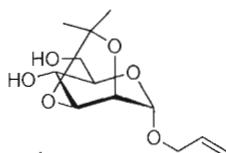
Une quantité de 6-iodo- α -D-rhamnopyrannoside d'allyle **80** (358 mg, 1,13 mmol) est dissoute dans un volume de toluène (10 mL) qui est ensuite chauffée à reflux (110°C). Des quantités de Bu₃SnH (0,5 mL, 1,9 mmol, 1,6 équiv.) et d'AIBN (0,18 mg, 0,11 mmol, 0,1 équiv.) sont ajoutées au mélange réactionnel puis chauffé à reflux. La réaction est suivie par CCM (H₂O/ACN 1:9) jusqu'à disparition complète du produit de départ (2h). Le mélange réactionnel est filtré, évaporé puis purifié sur colonne de silice (H₂O/ACN 1:9) pour donner une huile incolore de α -D-rhamnopyrannoside d'allyle **81** (174 mg, 75% rend.).

Méthode 2: Chauffage aux micro-ondes

À une quantité de 6-iodo- α -D-rhamnopyrannoside d'allyle **80** (63 mg, 0,20 mmol) est dissoute dans un volume de toluène (2 mL) et à cette solution sont ajoutées des quantités de Bu₃SnH (0,08 mL, 0,30 mmol, 1,5 équiv.) et d'AIBN (4 mg, 0,02 mmol, 0,1 équiv.). Le tout est scellé dans un tube (5 mL) sous atmosphère d'azote et irradié aux micro-ondes à intensité *power high* à température de 120°C. La réaction est suivie par CCM (H₂O/ACN 1:9) jusqu'à disparition complète du produit de départ (5 min). Le mélange réactionnel est filtré, évaporé puis purifié sur colonne de silice (H₂O/ACN 1:9) pour donner une huile incolore de α -D-rhamnopyrannoside d'allyle **81** (36 mg, 88% rend.); Rf=0,57 (H₂O/ACN 1:9); Rf=0,33 (MeOH/CHCl₃ 1:9); $[\alpha]_D^{23} = -4$ (c= 1.0, MeOH). **¹H RMN (300 MHz, D₂O, 25°C):** δ = 6,04-5,91 (m, 1H, 1-OCH₂CH=CH₂), 5,40-5,27 (m, 2H, 1-OCH₂CH=CH₂), 4,85 (s, 1H, H-1), 4,26-4,04 (m, 2H, 1-OCH₂CH=CH₂), 3,95 (dd, 1H, J_{1,2} = 1,7 Hz, J_{1,3} = 3,4 Hz, H-2), 3,78-3,70 (m, 2H, H-3, H-5), 3,45 (t, 1H, J_{1,2} = 9,6 Hz, H-4), 1,3 (d, 3H, J_{1,2} = 6,3 Hz, 6-CH₃) ppm. **¹³C RMN (75 MHz, D₂O + acétone):** δ = 133,97 (1-OCH₂CH=CH₂), 119,28 (1-

OCH₂CH=CH₂), 99,79 (C-1), 72,72 (C-3), 70,97 (C-4), 70,82 (C-2), 69,35 (C-5), 68,98 (1-OCH₂CH=CH₂), 17,22 ppm (C-6). **ESI-MS**: *m/z* calculé pour [C₉H₁₆O₅+Na]⁺: 227,0895; trouvé: 227,1.

2,3-*O*-Isopropylidène-α-D-mannopyrannoside d'allyle (83)¹⁵⁰

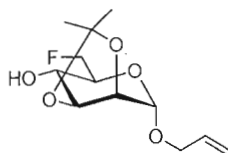


Une quantité d'α-D-mannopyrannoside **7** (1,24 g, 5,62 mmol) d'allyle est dissoute dans un mélange acétone/DMP 1:1 (20 mL). Une quantité de *p*TSOH (100 mg, 0,58 mmol, 0,1 équiv.) est ajouté puis laissé agiter à température pièce. La réaction est suivie par CCM (AcOEt/Hex 7:3) jusqu'à disparition complète du produit de départ (15 min). Le produit obtenu, le 2,3,4,6-*O*-diisopropylidène-α-D-mannopyrannoside d'allyle **82**, n'est pas isolé (R_f=0,25; AcOEt/Hex 3:7). Une quantité d'eau est ajoutée (20 mL) puis la réaction est laissée agiter à température pièce. La réaction est suivie par CCM (AcOEt/Hex 1:1) jusqu'à disparition complète du produit de départ (3h). Le mélange réactionnel est neutralisé au NaHCO₃ sat. (4 mL), dissous dans l'eau (10 mL) puis extrait dans l'hexanes (4×6 mL). Le produit brut résultant cristallisé dans un mélange Et₂O/EP pour donner solide blanc de 2,3-*O*-isopropylidène-α-D-mannopyrannoside d'allyle **83** (1,46 g, 65% rend. sur 2 étapes); T_{fus}: 80-81°C; R_f=0,29 (AcOEt/Hex 1:1); [α]_D²³ = +39 (c = 1,0, CHCl₃). **¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25°C)**: δ = 5,90 (m, 1H, 1-OCH₂CH=CH₂), 5,34-5,20 (m, 2H, 1-OCH₂CH=CH₂), 5,08 (s, 1H, H-1), 4,23-4,15 (m, 2H, 1-OCH₂CH=CH₂), 4,04-3,60 (m, 6H, H-2, 3, 4, 5, 6a, 6b), 1,53 (s, 3H, C(CH₃)₂), 1,36 (s, 3H, C(CH₃)₂) ppm. **¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25°C)**: δ = 133,30 (1-OCH₂CH=CH₂), 118,02 (1-OCH₂CH=CH₂), 109,57 (C(CH₃)₂), 96,35 (C-1), 78,31 (C-5), 75,35 (C-2), 69,69 (C-3), 69,24 (1-OCH₂CH=CH₂), 68,13 (C-4), 62,18 (C-6), 27,89

¹⁵⁰ Chernyak, A. Y., Levinsky, A. B., Dmitriev, B. A., and Kochetkov N. K., *Carb. Res.*, **1984**, 128, 269-282

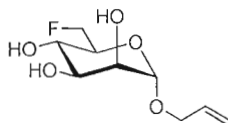
(C(CH₃)₂), 26,09 (C(CH₃)₂) ppm. **ESI-MS**: m/z calculé pour [C₁₂H₂₀O₆+H]⁺: 261,1338; trouvé: 261,1.

6-Fluoro-2,3-*O*-isopropylidène-α-D-rhamnopyrannoside d'allyle (**84**)



Une quantité de 2,3-*O*-isopropylidène-α-D-mannopyrannoside d'allyle **83** (123 mg, 0,46 mmol) est dissoute dans un volume de DCM (5 mL) à -78°C dans un bain acétone-glace sèche. Une quantité de DAST (0,07 mL, 0,53 mmol, 1,1 équiv.) est ajoutée puis le tout est laissé agiter à température pièce. La réaction est suivie par CCM (AcOEt/Hex 1:9) jusqu'à disparition complète du produit de départ (20 min). Une quantité de MeOH est ajoutée (0,2 mL) au mélange réactionnel pour neutraliser le DAST puis laissé agiter toute une nuit (16h). Le mélange réactionnel est concentré, dilué à l'AcOEt, lavé au NaHCO₃ sat., lavé au NaCl sat., séché au Na₂SO₄, évaporé puis purifié sur colonne de silice (AcOEt/Hex 1:9) pour donner une huile jaune de 6-fluoro-2,3-*O*-isopropylidène-α-D-rhamnopyrannoside d'allyle **84** (80 mg, 66% rend.); R_f=0,40 (AcOEt/Hex 1:9). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 5,91 (m, 1H, 1-OCH₂CH=CH₂), 5,35-5,23 (m, 2H, 1-OCH₂CH=CH₂), 5,10 (d, 1H, J₁₋₂ = 3,0 Hz, H-1), 4,72-3,84 (m, 8H, H-2, 3, 4, 5, 6a, 6b, 1-OCH₂CH=CH₂), 1,54 (s, 3H, C(CH₃)₂), 1,37 (s, 3H, C(CH₃)₂) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 133,03 (1-OCH₂CH=CH₂), 118,32 (1-OCH₂CH=CH₂), 110,06 (C(CH₃)₂), 96,24 (C-1), 89,63 (C-5), 87,23 (C-2), 82,42 (C-3), 80,12 (1-OCH₂CH=CH₂), 68,28 (C-4), 66,49 (C-6), 27,80 (C(CH₃)₂), 26,01 (C(CH₃)₂) ppm. **ESI-MS**: m/z calculé pour [C₁₂H₁₉O₅+H]⁺: 263,1295; trouvé: 263,1.

6-Fluoro-α-D-rhamnopyrannoside d'allyle (**85**)



Une quantité de 6-fluoro-2,3-*O*-isopropylidène- α -D-rhamnopyrannoside d'allyle **84** (44 mg, 0,17 mmol) est dissoute dans un mélange AcOH/H₂O 4:1 (5 mL) puis chauffé à 80°C. La réaction est suivie par CCM (AcOEt/Hex 1:1) jusqu'à disparition complète du produit de départ (2h). Le produit brut résultant est concentré puis purifié sur colonne de silice (AcOEt/Hex 1:1) pour donner un solide blanc de 2-*O*-méthyl- α -D-mannopyrannosiduronique de méthyle **85** (31 mg, 84% rend.); R_f=0,24 (AcOEt/Hex 1:1). **¹H NMR (300 MHz, D₂O, 25°C):** δ = 5,89 (m, 1H, 1-OCH₂CH=CH₂), 5,33-5,21 (m, 2H, 1-OCH₂CH=CH₂), 4,74 (m, 2H, 1-OCH₂CH=CH₂), 4,22-3,83 (m, 6H, H-2, 3, 4, 5, 6a, 6b), 3,53 (s, 1H, H-1) ppm. **¹³C NMR (75 MHz, D₂O + acétone, 25°C):** δ = 133,14 (1-OCH₂CH=CH₂), 117,94 (1-OCH₂CH=CH₂), 98,71 (C-1), 88,70 (C-5), 86,35 (C-2), 82,46 (C-3), 80,16 (1-OCH₂CH=CH₂), 71,23 (C-4), 69,93 (C-6) ppm. **ESI-MS:** m/z calculé pour [C₉H₁₅O₅+H]⁺: 222,0904; trouvé: 223,1.